

Humboldt Universität zu Berlin

Dissertation

Die B-Zell-Antwort im Synovialgewebe von Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalia (Dr.rer.nat)

im Fach Biologie

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I

Dipl.Biol. Tobias Scheel

Dekan: Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. Andreas Radbruch
 2. PD Dr. Claudia Berek
 3. Prof. Dr. Hans Dieter Volk

eingereicht: 03.08.2009

Datum der Promotion: 30.11.2009

Zusammenfassung

Obwohl B-Zellen in der Pathogenese der Rheumatoide Arthritis (RA) eine wichtige Rolle spielen, ist über ihre Aktivierung und Differenzierung im Synovialgewebe (SG) nicht viel bekannt. Ein Merkmal von RA ist das Auftreten von Autoantikörpern (auto-AK). Trotz dessen sind bisher kaum Daten über den Einfluss des SG auf die auto-AK-Produktion und die Frequenz autoreaktiver synovialer B-Zellen bekannt.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der synovialen B-Zell-Antwort und der Spezifität synovialer B-Lymphozyten. Dazu wurden B- und Plasmazellen (PC) aus dem Synovialgewebe von RA-Patienten mittels Mikrodissektion und Durchflusszytometrie isoliert und ihr Immunglobulin(Ig)-Repertoire bestimmt. Die Analyse der V_H-Gene zeigte, dass sowohl naive als auch Gedächtnis-B-Zellen in das SG einwandern können. Ein Vergleich der VDJ-Rearrangements aus B-Zellen und PC belegte, dass hauptsächlich Gedächtnis-B-Zellen Antigen-abhängig aktiviert werden, klonal expandieren und zu PC differenzieren. Dabei können aktivierte B-Zellen ihre Ig-Klasse wechseln. Im Gegensatz dazu wurden nur rudimentäre Anzeichen somatischer Hypermutation nachgewiesen.

Um die Spezifität synovialer B-Lymphozyten zu ermitteln, wurden rekombinante AK aus synovialen B-Zellen und PC generiert. Der Polyreaktivitätstest zeigte, dass naive B-Zellen aus dem SG einen hohen Anteil polyreaktiver Zellen besitzen. Im Gegensatz dazu ist die Frequenz von autoreaktiven Gedächtnis-B-Zellen und PC gegenüber naiven B-Zellen erhöht. Daneben konnten auch spezifische AK gegen bakterielle Antigene (insbesondere gegen Parodontitis-auslösende Bakterien) und gegen das Auto-Ag MCV identifiziert werden. Eine Affinitätsmessung des MCV-spezifischen Auto-AK zeigte, dass im SG sezernierte Auto-AK eine sehr hohe Affinität erreichen können.

Die hier gewonnenen Daten verdeutlichen, dass B-Lymphozyten entscheidend an der Aufrechterhaltung oder gar Entstehung von RA beteiligt sind.

Schlagworte

Rheumatoide Arthritis, B-Zelle, Plasmazelle, Antikörper, Immunantwort, Synovialgewebe, Autoreaktivität, Polyreaktivität, Affinität, V_H-Gen-Repertoire, Laser-Capture-Mikrodissektion

Summary

Although B cells have an important impact on the pathogenesis of Rheumatoid arthritis (RA) still surprisingly little is known about their activation and differentiation within the inflamed synovial tissue (ST). A hallmark of RA is the presence of auto-antibodies (auto-Ab). However, still little is known about the frequency of self reactive synovial lymphocytes and it is unclear to which extent the inflamed ST contributes to auto-Ab production.

This thesis deals with the characterization of the synovial B cell response and the specificity of synovial B lymphocytes. B and plasma cells (PC) from RA patients were isolated either by Laser Capture Microdissection or by FACS and their immunoglobulin(Ig)-repertoire was determined. The analysis of the V_H-genes revealed that both naïve and memory B cells can immigrate the ST. A comparison of VDJ-rearrangements of B cells and PC showed that in ST without ectopic germinal centres mainly memory B cells become activated, expand clonally and differentiate into PC. During this process B cells can switch their Ig-class but do only hypermutate slightly.

To determine the specificity of synovial B lymphocytes, recombinant Ab from synovial B cells and PC were generated. The polyreactivity assay showed that particularly naïve B cells were polyreactive. In contrast, the frequency of autoreactive memory B cells and PC was much higher than that of naïve B cells. In addition, Ab specific for bacterial antigens (especially for periodontal bacterias) and for the autoantigen MCV were identified. The affinity measurement of the MCV-specific autoantibody revealed that auto-Ab secreted in the ST can exhibit very high affinities.

The data presented here show that B cells seem to play an important role in the maintenance and possibly the development of RA.

Key words

Rheumatoid Arthritis, B cell, plasma cell, antibody, immune response, synovial tissue, autoreactivity, polyreactivity, affinity, V_H-gene-repertoire, Laser Capture Microdissection

**„Wenn man eine Katze auseinandernehmen
will, um zu sehen, wie sie funktioniert, hat man
als erstes eine nicht funktionierende Katze in den
Händen.“**

Douglas Noël Adams (1952 – 2001), britischer Schriftsteller

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt **Dr. Claudia Berek**, die mir die Möglichkeit gab, diese Doktorarbeit in ihrem Labor durchzuführen. Ich danke ihr für ihre kompetente und faire Betreuung und Unterstützung sowie das Interesse, mit dem sie den Verlauf meiner Arbeit verfolgte.

Ich möchte mich auch bei allen Mitgliedern der **AG Berek**, und im Besonderen bei **Gudrun Steinhauser** und **Stefanie Schürer** bedanken, die mit ihrer Hilfe immer zur Stelle waren und mich stets tatkräftig unterstützten.

Ich bedanke mich bei **Prof. Dr. Andreas Radbruch**, **Prof. Dr. Arturo Zychlinsky** und **Prof. Dr. Hans Dieter Volk** für die Begutachtung der Dissertationsarbeit. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Frau **Dr. Michal Or-guil**, die sich als Kommissionsmitglied ebenfalls zur Beurteilung der vorliegenden Arbeit bereit erklärte.

Bei **Dr. Hedda Wardemann** und im Besonderen **Dr. Thomas Tiller** bedanke ich mich recht herzlich, dass sie es mir ermöglichten, in ihrem Labor zu arbeiten. Ohne ihre Unterstützung wäre es nicht so einfach gewesen über 100 rekombinante Antikörper zu generieren.

Desweiteren wäre die Arbeit ohne die synovialen Gewebeproben nicht möglich gewesen. Ich bedanke mich bei **Prof. Dr. Josef Zacher**, **Dr. Angelika Gursche** und **Frau Christine Winter** aus dem Helios-Klinikum, Berlin Buch, für die unkomplizierte Zusammenarbeit. Auch bei **Dr. Martin Lautenbach** aus dem Immanuel Krankenhaus, Berlin Wannsee, bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit bei der Beschaffung des Patientenmaterials.

Herrn **Dr. Thomas Häupl** danke ich ebenfalls für die Bereitstellung von Patientenmaterial und für viele hilfreiche Diskussionen und Anregungen.

Die Bestimmung der Ag-Spezifität wäre ohne die tatkräftige Unterstützung von **Dr. Nicole Pischon**, **Dr. Eric Röhner** und **Verena Kanitz** aus der Parodontologie der Charité, die mich mit den Parodontitis-auslösenden Bakterien versorgten, nicht möglich gewesen. **Prof. Dr. Harald Burkhardt** (J.W. Goethe-Universität, Frankfurt a.M.) danke ich für die Bereitstellung von humanen Kollagen Typ II.

Bei **Dr. Sebastien Lacroix-Desmazes** und **Dr. Jorden Dimitrov** aus dem Centre de Recherche des Cordeliers in Paris, möchte ich mich für die tolle und überaus erfolgreiche Zusammenarbeit mit der *Surface Plasmon Resonance-Technologie* bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen **Mitarbeitern des DRFZ**, den **Labmanagern** und dem **FCCF-Team** für die tatkräftige Hilfe auf allen Ebenen bedanken.

Ein großen Dankeschön gebührt auch meinen **Freunden**, meiner **Familie** und **allen anderen**, die sich jetzt angesprochen fühlen. Sie alle leisteten einen Beitrag dazu, dass ich ab und an etwas Abstand zu meiner Arbeit gewinnen und daraus neue Motivation beziehen konnte.

Zu guter Letzt möchte ich **Annabella Wagner** und **Susann Winter** für die überaus kritische Revision meiner Arbeit danken.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	2
Summary	3
Danksagung	5
Inhaltsverzeichnis	6
Abkürzungen	9
Einleitung	10
Die B Zelle und ihre Spezifität	10
Entwicklung von B Zellen	12
B-Zell-Aktivierung	13
Die T-Zell-abhängige B-Zell-Antwort	13
Die T-Zell-unabhängige B-Zell-Antwort	15
Die Reaktivierung von Gedächtnis-B-Zellen	15
Funktionen von Antikörpern	16
Natürliche Auto- und Polyreaktivität von B-Zellen	17
Rheumatoide Arthritis	18
Symptome und Diagnose	18
Pathophysiologie	20
Die Rolle von B-Zellen im entzündeten Synovialgewebe	21
Fragestellung	23
Ergebnisse	24
Heterogener Phänotyp von Synovialgeweben	24
Immunantwort im Synovialgewebe	26
Vergleichende Sequenzanalyse von mikrodisezierten B-Zellen und PC	26
Vergleichende Sequenzanalyse von sortierten B-Zellen und PC	28
Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen im Synovialgewebe	31
Klonale Expansion im Synovialgewebe	31
Ig-Klassenwechsel in synovialen B-Zellen	35
Hinweise für eine Selektion von synovialen PC	38
Analyse der Spezifität synovialer B-Lymphozyten	38
Hohe Frequenz polyreaktiver naiver B-Zellen im SG von RA-Patienten	38
Hoher Anteil autoreaktiver Gedächtnis-B-Zellen und PC im SG von RA-Patienten	40
Autoreaktivität an humanen Leberzellextrakten	40
Autoreaktivität an HEp-2-Zellen	40
Autoreaktivität im Synovialgewebe	42
Häufiges Auftreten bakterienspezifischer Zellen im SG von RA-Patienten	44
Synoviale PC erkennen RA-assoziierte Autoantigene	45
Sezernierung von hoch affinen Autoantikörpern im SG	46

Diskussion	48
Ungerichtete Amplifikation humaner Ig-Gene.	48
Lokale Aktivierung von B-Zellen im SG	49
Selektioniertes Ig-Repertoire in synovialen Gedächtnis-B-Zellen und PC	49
Anhäufung klonal verwandter Zellen im SG	50
Ig-Klassenwechsel im SG	51
Anzeichen für eine selektionierte synoviale PC-Population	52
Bevorzugte Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen	52
Hoher Anteil polyreaktiver naiver B-Zellen	53
Expression hoch affiner Autoantikörper im SG	54
Sezernierung bakterienspezifischer Antikörper im SG	57
Modell zur synovialen B-Zell-Antwort	58
Material	59
Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	59
Enzyme	59
Zellen, Bakterien, Vektoren	60
Antikörper	60
Oligonukleotide	60
Kits	62
Geräte	62
Software	62
Methoden	63
Patienteninformationen	63
Histologie	63
Anfertigen mikroskopischer Schnitte	63
Immunofluoreszenz	64
Immunhistochemie	64
Analyse des V-Gen Repertoires mittels Laser-unterstützter Mikrodissektion	64
Fluoreszenzfärbung für Laser-unterstützte Mikrodissektion	64
Laser-unterstützte Mikrodissektion (Laser capture microdissection, LCM)	65
RNA Gewinnung und Bestimmung der RNA Integrität	65
Reverse Transkriptase Reaktion und PCR Amplifikation	65
Gelelektrophorese und Gelextraktion	66
TOPO TA-Klonierung, Transformation und Plasmid-Präparation	66
Sequenzierungsreaktion und Ethanol-Fällung	67
Auswertung der Sequenzen	67

Ermittlung der Spezifität synovialer B-Lymphozyten	67
Kollagenase-Verdau von Synovialgewebe	67
Einzelzellsortierung mittels Durchflusszytometrie	68
Reverse Transkriptase-Reaktion und PCR-Amplifikation (1. PCR) der Immunglobulin-Gene	68
Reamplifikation (2.PCR) und primäre Sequenzierung	70
Spezifische PCR	71
Klonierung in Expressionsvektoren	72
<i>Screening</i> -PCR, Plasmid-Präparation und sekundäre Sequenzierung	72
Transfektion von HEK 293T Zellen	73
Bestimmung der Konzentration und Spezifität rekombinanter Antikörper durch <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	74
Ermittlung der Autoreaktivität durch <i>Immunoplotting</i> an Leberzellextrakten	75
Aufreinigung rekombinanter Antikörper mittels ProteinG und Konzentrationsbestimmung	75
Ermittlung autoreaktiver Antikörper durch HEp2-Zellen	76
Ermittlung der Affinität rekombinanter Antikörper durch <i>Surface Plasmon Resonanz</i> Analyse	76
Anhang	77
Referenzen	82
Eidesstattliche Erklärung	90

Abkürzungen

A.a.	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Ag	Antigen(e)
BCR	B-Zell-Rezeptor (B cell receptor)
bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serumalbumin (bovine serum albumin)
CCP	cyklisches citrulliniertes Peptid
CD	Cluster of Differentiation, Oberflächenmoleküle auf Immunzellen
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
CDR	hypervariable Region eines Ig (complementary determining region)
CRP	C-reaktives Protein
CSR	Klassenwechsel (class switch recombination)
DAS28	Krankheits-Aktivitäts-Maß (Disease Activity Score) auf der Grundlage von 28 Gelenken
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
E.c.	<i>Enterobacter cloacae</i>
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
E.f.	<i>Enterococcus faecalis</i>
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
FCS	Rinderkälberserum (fetal calf serum)
FDC	follikuläre dendritische Zelle(n)
F.n.	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
FR	Gerüstregion eines Ig (framework region)
HEK 293T	human embryonic kidney 293 transformed with SV40 large T-antigen
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish Peroxidase)
Ig	Immunglobulin(e)
Ins	Insulin
Koll	Kollagen
LPS	Lipopolysaccharid
m	männlich
MCV	mutiertes citrulliniertes Vimentin
M.m.	<i>Morganella morganii</i>
n.g.	nicht getestet
oD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PC	Plasmazelle(n) (plasma cell)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
P.g.	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
P.i.	<i>Prevotella intermedia</i>
preBCR	Prä B-Zell-Rezeptor
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
RT	Raumtemperatur
SHM	somatische Hypermutation
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
S.m.	<i>Streptococcus mutans</i>
SPR	Surface Plasmon Resonance
TLR	Toll-like Rezeptor(en)
Vim	Vimentin
w	weiblich

Einleitung

Die B Zelle und ihre Spezifität

B-Lymphozyten sind die Vorläuferzellen der Antikörper-sezernierenden Plasmazellen (PC) und somit essentiell für die Ausbildung des humoralen Zweiges der spezifischen Immunantwort. Zusätzlich bilden aktivierte B-Zellen hoch affine Gedächtnis-B-Zellen und sind somit maßgeblich am immunologischen „Gedächtnis“ beteiligt.

Das Merkmal der B-Zellen ist der B-Zell-Rezeptor (engl.: B cell receptor, BCR), den B-Zellen auf ihrer Zelloberfläche tragen. Jede B-Zelle exprimiert einen ganz individuellen BCR, mit einer einzigartigen Spezifität. Dies verhindert Kreuzreaktivität, da jede B-Zelle nur Rezeptoren einer Spezifität besitzt.

Der BCR ist die Membran-gebundene Form eines Antikörpers. Er besteht aus glykolysierten leichten und schweren Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede dieser Ketten besteht aus einer variablen Region, die das Antigen (Ag) bindet, und einem konstanten Teil, der für die funktionellen Eigenschaften des Moleküls verantwortlich ist (Abb.1A).

Die variablen Bereiche der leichten und schweren Ketten sind nicht auf ihrer ganzen Länge variabel. Sie enthalten jeweils drei getrennte hypervariable Abschnitte (engl.: complementary determining region, CDR), welche die Ag-Bindungsschleifen bilden. Die Basenabfolge in den CDR bestimmt die dreidimensionale Struktur der Ag-Bindungsstelle und somit die Spezifität des BCR bzw. Antikörpers (Abb.1).

Der menschliche Organismus besitzt ca. 10^9 bis 10^{10} verschiedene B-Zellen, die sich in der Spezifität ihres BCR unterscheiden [1]. Diese enorme Zahl potenzieller Antikörper wird durch eine zufällige Rekombination der in der Keimbahn vorgegebenen Gensegmente für die variablen Regionen der leichten und schweren Kette gebildet (Abschnitt 2.2) [2].

Die variablen Bereiche der leichten Kette werden von V- (engl.: variable) und J-Gensegmenten (engl.: joining) gebildet. Die variablen Regionen der schweren Kette bestehen ebenfalls aus V- und J-Regionen, zwischen denen sich zusätzlich noch D-Segmente (engl.: diversity) befinden. Für jedes Segment der variablen Region steht eine Vielzahl frei kombinierbarer Segment-Varianten zur Verfügung (Anhang). Die Verknüpfung zwischen V_L und J_L bzw. V_H , D und J_H führt zur vollständigen variablen Region der leichten bzw. schweren Ig-Kette [3,4]. Neben dieser genetischen und kombinatorischen Vielfalt erzeugt die Einführung zusätzlicher Nukleotide, so genannter N- (engl.: non-template) und P-Nukleotide (engl.: palindromic), an den Verknüpfungsstellen der V-, D- und J-Segmente eine zusätzliche Variabilität (Verknüpfungsvariabilität).

Die variablen Regionen werden mit jeweils einer konstanten Region kombiniert. Bei der leichten Kette ist dies entweder κ oder λ . Jede der verschiedenen schweren Ketten kann mit einer der vielen möglichen leichten Ketten verknüpft werden. Auf diese Art generiert jede B-Zelle einen individuellen BCR. Somit kann der BCR als klonaler Marker für B-Zellen herangezogen werden.

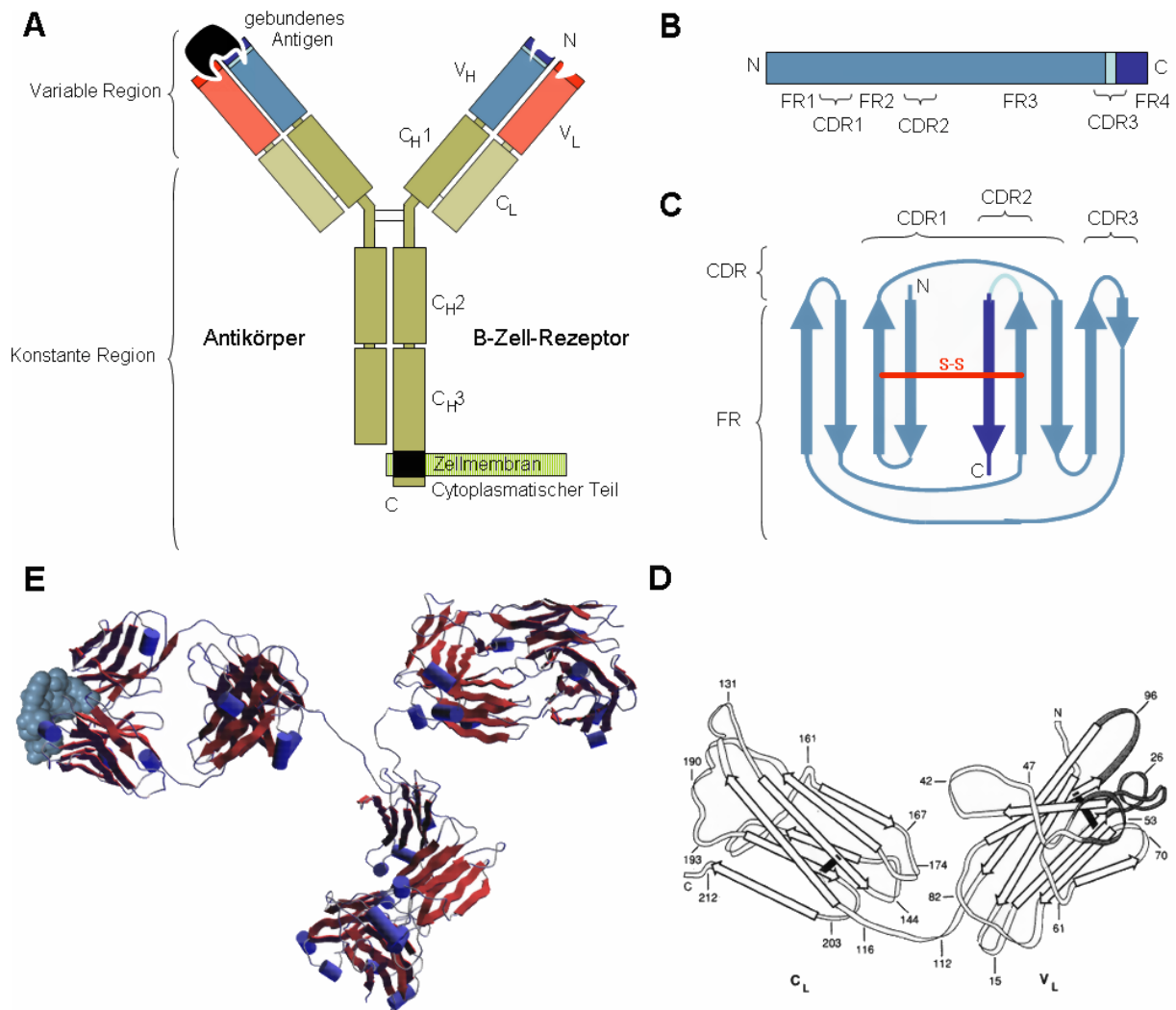


Abb. 1: Struktur von Immunglobulinen

A) Schema eines Ig. Die linke Hälfte der Abbildung stellt eine IgG-Molekülhälfte dar, die rechte Seite den B-Zell-Rezeptor, der in der Zellmembran verankert ist. Die C-terminalen Domänen sind für den jeweiligen Isotyp für alle Antikörper identisch. Die N-terminalen Domänen sind sehr variabel. **B-E)** Die Ketten werden aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in Ig-Domänen mit β -Faltblattstruktur gegliedert. **B)** Schema der variablen Domäne der schweren Ig-Kette. Sie setzt sich aus V_H - (blau), D - (hellblau) und J_H -Segmenten (dunkelblau) zusammen. Die Sequenzvariabilität verschiedener variabler Domänen ist ungleich verteilt. CDR3 ist am variabelsten, da sie sich aus allen drei Gensegmenten zusammensetzt. **C)** Die Gerüstregionen (FR) bilden die β -Stränge der Faltblätter und die hypervariablen Regionen (CDR) drei Schleifen, welche die β -Stränge verbinden. Die β -Stränge sind in zwei Etagen angeordnet, die durch eine Disulfidbrücke (rot) stabilisiert werden. **D)** Die hypervariablen Schleifen (CDR) liegen in der gefalteten Struktur benachbart und formen die Ag-Bindungsstelle. Die β -Faltblätter werden in zwei Etagen zu 4 bzw. 5 β -Faltblättern angeordnet und bilden ein konserviertes Faltungsmotiv [5]. **E)** Tertiärstruktur eines IgG-Antikörpers. Die Sekundärstruktur des Antikörpers wurde durch blaue Zylinder (α -Helices) und rote Pfeile (β -Faltblätter) dargestellt. Die blauen Kugeln repräsentieren ein an den variablen Teil des Antikörpers gebundenes Ag. (<http://www.zib.de/MDGroup/proteinlab/changes/antibodypage.html>)

In der späteren Entwicklung der B-Zellen, kann die μ -konstante Region der schweren Kette mit der δ -, γ -, α - oder ϵ -konstanten Region ausgetauscht werden. Dadurch wird der Isotyp des Immunglobulins (Ig) bestimmt (IgM, IgD, IgG, IgA bzw. IgE). Die verschiedenen Isotypen besitzen unterschiedliche immunologische Funktionen (Abschnitt 2.4).

Entwicklung von B Zellen

Die frühe B-Zellentwicklung findet im Knochenmark statt. Wie alle Zellen des Immunsystems entwickeln sich B-Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen in einer Serie von Entwicklungsschritten. Diese Stadien werden durch die geordnete Abfolge von somatischen Rekombinationen (Rearrangement) definiert [6]. Mehrere Kontrollpunkte vermitteln die Weiterentwicklung der B-Lymphozyten mit funktionellem BCR (positive Selektion) und verhindern die Reifung von autoreaktiven B-Zellen (negative Selektion) [7,8,9,10].

Die frühesten Zellen, die eindeutig für die Entwicklung zur B-Zelle determiniert sind, sind pro-B-Zellen (engl.: progenitor). In diesem Stadium erfolgt die erste Umordnung des Lokus für die schwere Ig-Kette. Im frühen pro-B-Zell-Stadium wird zufällig ein D-Gensegment mit einem J_H-Gensegment verknüpft (Abb.2). Diese Umlagerung geschieht meist auf beiden Allelen. In der späten pro-B-Zelle wird eines der entstandenen D-J_H-Segment mit einem V_H-Gensegment verknüpft. Die zweite Rekombination erfolgt zunächst nur auf einem Allel. Ist dieses V_H-D-J_H-Rearrangement produktiv, wird die Umlagerung des zweiten Allels unterdrückt (Allelausschluss). Durch den Allelausschluss wird sichergestellt, dass jede B-Zelle nur Ig einer einzigen Spezifität trägt. B-Zellen, die auf beiden Allelen kein produktives Ig-Gen rekombinieren konnten, sterben durch Apoptose [2,11].

Die funktionale schwere Kette wird zusammen mit der so genannten surrogaten leichten Kette als prä-B-Zell-Rezeptor (prä-BCR) auf der Oberfläche exprimiert (Abb.2). Zellen, die einen solchen Rezeptor tragen, werden prä-B-Zellen (engl.: precursor) genannt. Mit der Expression des prä-BCR korreliert das Abschalten des Rekombinationsprozesses der schweren Ig-Kette. Der prä-BCR bewirkt dabei den Allelausschluss, der die Expression nur einer schweren Kette sicherstellt. Außerdem vermittelt der prä-BCR ein Proliferationssignal [12] und selektioniert somit Zellen mit funktionaler schwerer Kette für die weitere Entwicklung (positive Selektion). Prä-B-Zellen rearrangieren in ihrer weiteren Entwicklung die leichten Ig-Gensegmente [13], indem ein V_L-Gensegment an ein J_L-Gensegment angelagert wird. Die Rekombination der Igκ-Gensegmente geschieht vor den Igλ-Gensegmenten [14,15]. Falls keine V_L-J_L-Umlagerung im richtigen Leseraster erfolgt, stirbt die Zelle durch Apoptose (positive Selektion).

Prä-B-Zellen, die eine funktionelle leichte Kette exprimieren, differenzieren zu unreifen B-Zellen und tragen einen vollständigen IgM-BCR auf ihrer Oberfläche (Abb.2). In diesem Stadium werden B-Zellen, die körpereigene Strukturen erkennen, in mehreren Selektionsprozessen ausgelesen. Sie können entweder ihre Spezifität durch sekundäre Genumlagerungen an den bereits rearrangierten Loci der leichten Ketten verändern (Rezeptor-Editing) [16,17,18,19,20] oder gehen durch Apoptose verloren (negative Selektion).

So selektionierte unreife B-Zellen verlassen das Knochenmark und entwickeln sich in der Peripherie zu reifen B-Zellen, die außer dem IgM-BCR auch den IgD-BCR exprimieren. Reife B-Zellen migrieren in die Follikel der sekundären lymphatischen Organe. B-Zell-Follikel werden von einem Netz aus follikulären dendritischen Zellen (FDC) durchzogen, die den B-Zellen Überlebenssignale übermitteln. Follikuläre B-Zellen können die Follikel wieder verlassen und über das Blut zu anderen sekundären lymphatischen Organen zirkulieren. Erkennen sie ihr spezifisches Ag durch ihren BCR, kommt es zur primären B-Zell-Antwort.

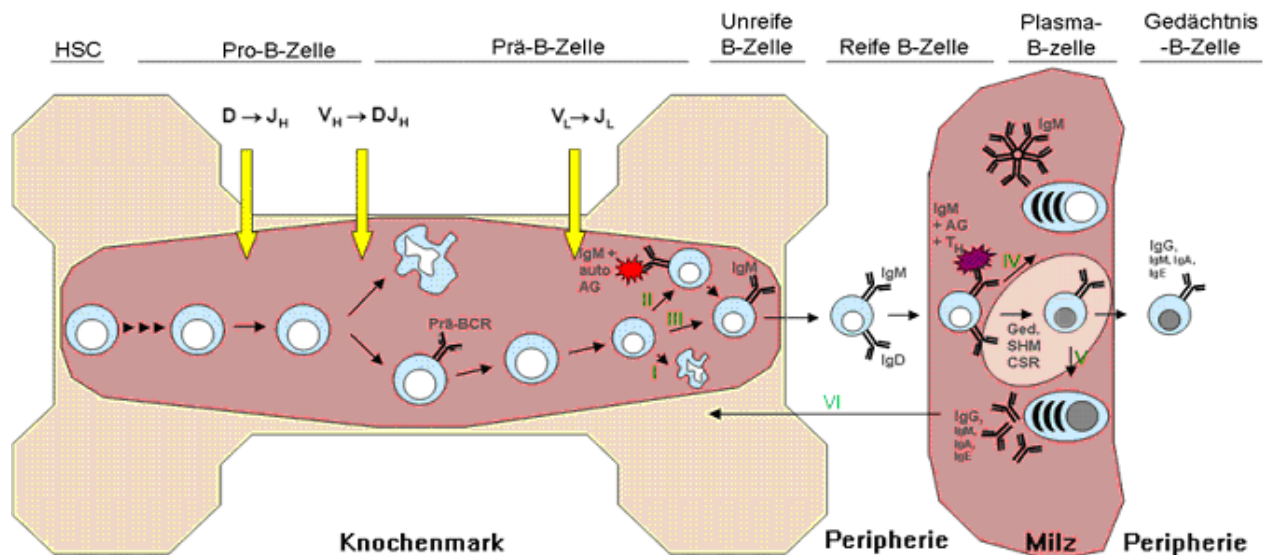


Abb. 2: Schematische Übersicht der Entwicklung und terminalen Differenzierung von B-Zellen.

Die Namen der jeweiligen Entwicklungsstadien sind im oberen Teil der Abbildung angegeben. Rekombinationsereignisse werden durch gelbe Pfeile angedeutet. (I) Zellen ohne funktionelle leichte Kette gehen in Apoptose. (II) Zellen, die körpereigene Strukturen erkennen, können z.T. ihre leichte Kette neu rearrangieren. (III) unreife B-Zellen verlassen das Knochenmark. (IV) Extrafollikuläre Expansion von aktivierten B-Zellen. (V) sezernation hoch affiner Antikörper nach Keimzentrumsreaktion. (VI) Ein Teil der IgG-PC kann zurück ins Knochenmark migrieren und dort zu langlebigen PC differenzieren.

B-Zell-Aktivierung

Die T-Zell-abhängige B-Zell-Antwort

Der BCR auf den B-Zellen erkennt sein spezifisches Ag in löslicher Form, oder gebunden auf FDC in den Follikeln der lymphatischen Organe. B-Zellen, die ihr Ag gebunden haben, internalisieren und prozessieren das Ag und präsentieren Ag-Peptide über MHC-II-Moleküle. Gleichzeitig wandern sie an die Grenzen der T-Zell-Zonen, wo aktivierte T_H -Zellen die mit Ag-Peptiden beladenen MHC-II-Moleküle der B-Zellen erkennen [21,22]. Dieser T_H -Zell-Kontakt ist wichtig, um den B-Zellen ein zweites, kostimulatorisches Aktivierungssignal zu geben.

Die aktivierten B-Zellen proliferieren entweder extrafollikulär (rote Pulpa der Milz bzw. Markstränge der Lymphknoten) und differenzieren zu IgM-sezernierenden kurzlebigen PC mit geringer Affinität [23] oder sie durchlaufen eine so genannte Keimzentrumsreaktion in den Follikeln, in der hoch affine IgG-sezernierende PC und ebenfalls hoch affine Gedächtnis-B-Zellen entstehen (Abb.3) [24].

Die extrafollikulären IgM-PC bilden innerhalb von 2-3 Tagen erste spezifische Antikörper, sind meist kurzlebig und sterben nach wenigen Tagen ab (Halbwertszeit 3-5 Tage) [25]. Die Anhäufungen extrafollikulärer PC bilden sich nach etwa 14 Tagen wieder zurück [26,27,28].

In der follikulären Keimzentrumsantwort wandern aktivierte B-Zellen in primäre Follikel ein und teilen sich zunächst für ca. 96h [24,29,30,31,32]. Die dabei entstandenen ca. 1000 Centroblasten durchlaufen den Prozess der somatischen Hypermutation (SHM), wobei durchschnittlich eine Mutation pro 1000 bp und Generation eingefügt wird. Die Mutationsrate liegt somit 10^7 mal höher als im übrigen Genom [33,34,35,36]. Das Einfügen von Mutationen in die Ig-Gene erhöht neben der kombinatorischen und der Verknüpfungsvariabilität das B-

Zell-Repertoire [37,38]. Die auf diese Art entstandenen Centrozyten tragen BCR unterschiedlicher Affinität zum Ag und teilen sich nicht mehr. Die verschiedenen Centrozyten binden natives Ag, das auf FDC mittels Ag-Antikörper- bzw. Ag-Komplement-Komplexen gebunden ist, unterschiedlich gut [39,40,41]. Dabei verdrängen Centrozyten mit hoher Affinität zum Ag Zellen mit geringerer Affinität [42] und konkurrieren damit um Überlebenssignale [43,44,45,46,47].

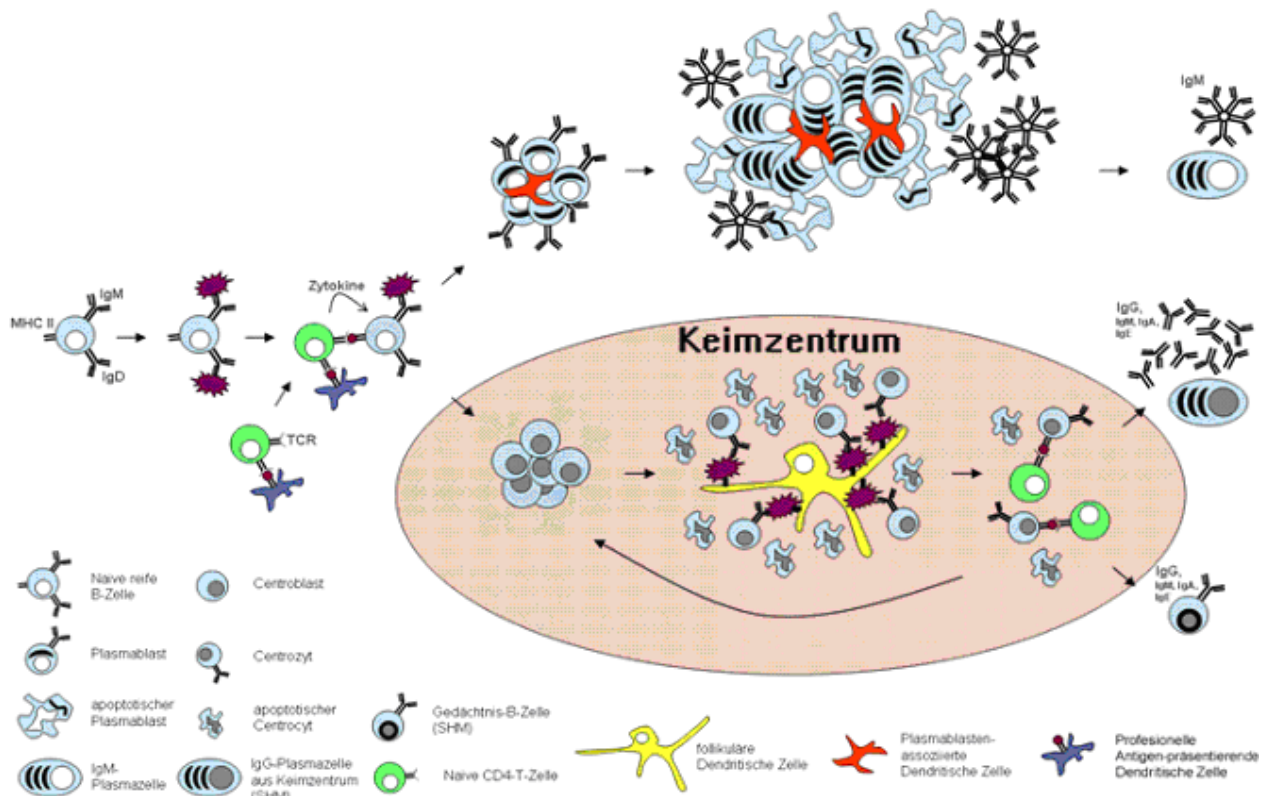


Abb. 3: Schematischer Ablauf der T-Zell-abhängigen Immunantwort.

Nach Erkennung ihres Ag wandern aktivierte B-Zellen an den Rand der T-Zell-Zonen, wo der Kontakt mit spezifischen CD4-T-Zellen erfolgt. Daraufhin können sie zwei Differenzierungswege einschlagen. Zum einen können sie zu extrafollikulären kurzlebigen IgM-PC, mit niedriger Affinität differenzieren. Zum anderen können sie ein Keimzentrum bilden. In diesem Stadium durchlaufen die Centroblasten genannten B-Zellen die somatische Hypermutation (gepunkteter Zellkern). So entstandene Centrozyten werden daraufhin an follikulären dendritischen Zellen für hohe Affinität zum Ag selektioniert und noch einmal mit spezifischen T-Zellen (T_{FH}) aktiviert. B-Zellen am Ende der Keimzentrumsreaktion können entweder zu IgG-sezernierenden PC mit hoher Affinität zum Ag und ggf. langlebig werden oder zu Gedächtnis-B-Zellen differenzieren.

Neben den Selektionsprozessen kommt es in der Keimzentrumsreaktion auch zur so genannten Klassenwechsel-Rekombination (engl.: class-switch-recombination, CSR), in deren Folge der konstante Bereich des Ig durch eine IgG-, IgA- oder IgE-schwere Kette ausgetauscht werden kann [43,48,49,50]. So entstandene hoch affine Centrozyten benötigen Kontakt mit spezifischen follikulären B-Helfer-T-Zellen (T_{FH}), von denen sie weitere Überlebens- und Entwicklungssignale erhalten [51,52,53]. Dabei werden autoreaktive Centrozyten zum Großteil eliminiert, weil sie keine passende T_{FH} -Zelle vorfinden [54,55,56]. Positiv selektionierte Centrocyten verlassen das Keimzentrum und differenzieren zu hoch affinen Gedächtnis-B-Zellen [57,58,59] oder zu ebenfalls hoch affinen Plasmablasten [60].

Während der Keimzentrumsreaktion kann die Affinität der Antikörper zum Ag um das Vielfache steigen. Darum wird die starke Selektion zu hoch affinen Antikörpern auch als Affinitätsreifung bezeichnet [32]. Ein Teil der

gebildeten hoch affinen Plasmablasten verlässt die sekundären lymphatischen Organe und migriert ins Knochenmark, in die Mukosa oder in entzündete Gewebe [61,62,63]. Im Knochenmark können die Plasmablasten in speziellen Überlebensnischen zu langlebigen PC ausdifferenzieren. Dort sezernieren sie über Jahre hinweg Antikörper gegen ihr Ag und tragen auf diese Art zu einer Langzeitimmunität bei [64,65,66,67,68,69].

Die T-Zell-unabhängige B-Zell-Antwort

Neben der T-Zell-abhängigen B-Zell-Antwort, können B-Zellen auch unabhängig von T-Zellen aktiviert werden (engl.: thymus-independent, TI). Dabei kommt es zu keiner Keimzentrumsreaktion und in der Regel auch nicht zu SHM, CSR und zur Bildung langlebiger Gedächtnis-B-Zellen bzw. PC. Generell ist die B-Zell-Antwort gegen TI-Ag weniger effizient als gegen T-Zell-abhängige Ag.

Es gibt zwei Mechanismen der T-Zell-unabhängigen B-Zell-Antwort. TI-1-Ag (z.B. Lipopolysaccharid, LPS) rufen meist eine polyklonale B-Zell-Aktivierung, unabhängig von der Spezifität der B-Zelle, hervor. Bei hoher Ag-Konzentration kann es zur Proliferation und Antikörper-Sekretion von bis zu 30% aller B-Zellen kommen. Die Aktivierung erfolgt über so genannte Toll-like-Rezeptoren (TLR), die konservierte bakterielle und virale Strukturen, wie Lipopolysaccharid (LPS), CpG und Peptidoglycan erkennen. Genügend starke Signale können zu einer B-Zell-Aktivierung führen.

Im Gegensatz dazu sind TI-2-Ag hoch repetitive Moleküle (z.B. Flagellin), die B-Zellen über eine ausgeprägte Kreuzvernetzung der BCR aktivieren. Im Gegensatz zu TI-1-Ag, sind TI-2-Ag nicht in der Lage, B-Zellen polyklonal zu aktivieren. Obwohl die Aktivierung durch TI-2-Ag T-Zell-unabhängig ist, sind Zytokine, die von T-Zellen sezerniert werden, für eine effektive B-Zell-Proliferation nötig. Sie können auch dazu führen, dass einige B-Zellen CSR durchlaufen [5].

Die Reaktivierung von Gedächtnis-B-Zellen

Langlebige Gedächtniszellen, werden bei erneutem Ag-Kontakt reaktiviert. Die Reaktivierung und die anschließende Differenzierung zu Plasmablasten (sekundäre B-Zell-Antwort) erfolgt rascher, stärker und ist länger andauernd als die primäre B-Zell-Antwort.

Das liegt zum einen daran, dass die Anzahl spezifischer Gedächtnis-B-Zellen deutlich höher ist als die spezifischer naive B-Zellen. Zum anderen sind Gedächtnis-B-Zellen einfacher zu aktivieren. Die zur Reaktivierung notwendigen Signale sind noch nicht vollständig bekannt. Ochsenbein et al. beschrieb, dass die Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen ebenfalls T-Zell-Hilfe benötigt [70,71]. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass Gedächtnis-B-Zellen bei einer HCMV-Infektion T-Zell-unabhängig zu PC ausdifferenzieren [72]. Eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Beschaffenheit des Ag sein. Während für Protein-Ag weiterhin T-Zell-Hilfe gebraucht wird, können komplexe Ag wie Viren Gedächtnis-B-Zellen T-Zell-unabhängig aktivieren. Dabei könnten Strukturen auf den komplexen Ag ähnlich den TI-1-Ag von z.B. TLR erkannt werden, die neben dem spezifischen Signal des BCR weitere Signale für die Aktivierung liefern.

Ebenfalls unklar ist, ob reaktivierte Gedächtnis-B-Zellen erneut eine Keimzentrumsreaktion durchlaufen. Nussenzweig zeigte, dass hoch affine B-Zellen in der Lage sind, Keimzentren zu besiedeln [73]. Dagegen sprechen Untersuchungen an HCMV-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen, die wenige Tage nach Reaktivierung ausschließlich extrafollikulär proliferierten und zu PC ausdifferenzierten. In Keimzentren wurden hingegen auch zu späteren Zeitpunkten nie Ag-spezifische Gedächtnis-B-Zellen gefunden [72,74]. Hinweise für eine vorwiegend extrafollikuläre Gedächtnis-B-Zell-Antwort sind schon länger bekannt [29,75]. Dem widersprechend konnte jedoch gezeigt werden, dass bei sekundärer und tertiärer Immunisierung, Antikörper auftreten, die weitere Mutationen angesammelt haben [76,77,78].

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass sich die Aktivierungskriterien, die Lokalisation und die Qualität der Gedächtnis-B-Zellen-Antwort von der Antwort naiver B-Zellen unterscheidet.

Funktionen von Antikörpern

Antikörper können durch Bindung an Pathogene drei Funktionen erfüllen.

- Neutralisation von Pathogenen um das Eindringen von Viren oder intrazellulär lebenden Bakterien zu verhindern, sowie die Neutralisation von bakteriellen Toxinen.
- Opsonisierung von Pathogenen, um Bakterien zu markieren, damit sie nach Bindung durch Fc-Rezeptoren phagozytiert werden können.
- Aktivierung des Komplementsystems, welches aus einer Anzahl von Plasmaproteinen besteht, die Pathogene opsonisieren oder Zellen direkt lysieren können.

Welche dieser Effektorfunktionen zum Tragen kommt, hängt von der Ig-Klasse des Antikörpers ab.

Lösliches IgM wirkt stark komplementaktivierend. Es wird im Zuge einer akuten Infektion als erstes Ig gebildet. IgD wird in geringen Mengen ebenfalls im Serum gefunden [79] und besitzt möglicherweise eine stimulierende Funktion für B-Zellen und Entzündungsreaktionen [80].

IgG ist die im Blut am häufigsten anzutreffende Ig-Klasse. Es erscheint im Verlauf einer Immunantwort später als IgM und tritt beim Menschen in vier Subklassen auf (IgG1 bis IgG4). Eine Funktion besteht in der Neutralisation von Viren oder Toxinen. IgG1, IgG2 und IgG3 führen zur klassischen Komplementaktivierung. IgG1 und IgG3 wirken opsonisierend. IgG2 und IgG4 werden aktiv über die Plazentabarriere in den Embryo bzw. Fötus transportiert und sorgen noch 2-3 Monate nach der Geburt für einen Immunschutz des Neugeborenen.

IgA kommt im Blut als Monomer vor, wird jedoch als Dimer über aktive Transportmechanismen zum Schutz äußerer Oberflächen des Organismus in Körperflüssigkeiten wie Tränen, Speichel oder Muttermilch sekretiert. Seine Hauptaufgabe erfüllt IgA im Darm, wo es hauptsächlich gebildet wird und maßgeblich an der Bekämpfung von Darmbakterien beteiligt ist.

IgE dient der Bekämpfung von Parasiten (Würmer und Protozoen). Es wird von Mastzellen und basophilen Granulozyten der Schleimhäute gebunden. Bei Kontakt mit einem passenden multivalenten Ag werden von den Granulozyten und Mastzellen Entzündungsmediatoren freigesetzt. Bei der Bindung von Allergenen an IgE, führt die Ausschüttung der Entzündungsmediatoren allerdings zur Herausbildung von Allergien.

Natürliche Auto- und Polyreaktivität von B-Zellen

Ein Charakteristikum von Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis (RA) und Systemischer Lupus Erythematoses (SLE) ist das Auftreten von Auto-Antikörpern. Autoreaktive B-Zellen können in vielen Stadien der B-Zell-Entwicklung entstehen. Auch während einer Immunantwort können autoreaktive B-Zellen gebildet werden, indem sie durch Fehlregulation der Immunantwort ihre Spezifität ändern [81].

In den letzten Jahren ist eine Vielzahl von Publikationen erschienen, die beschreiben, dass das Vorkommen selbstreaktiver B-Zellen keine Ausnahme darstellt. So sind 55% der frühen unreifen B-Zellen polyreaktive und 76% dieser Zellen autoreaktiv [10]. Dieser Anteil wird anschließend in mehreren Kontrollschritten verringert (Abb.4). Dennoch sind etwa 6% der naiven B-Zellen polyreaktiv und sogar 20% autoreaktiv. Ob diese Zellen aktivierbar sind, oder ob es sich um anerge Zellen handelt, ist nicht bekannt.

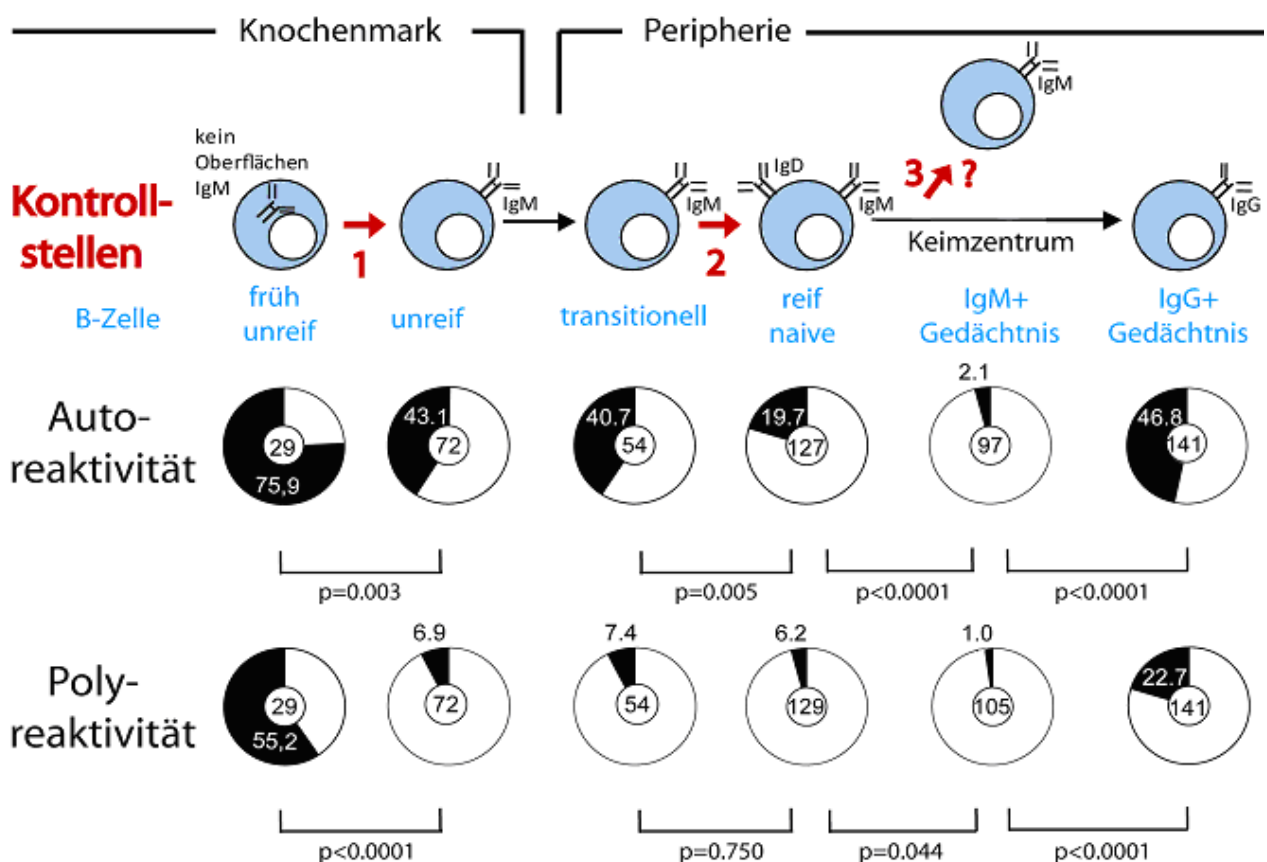


Abb. 4: Anteile an auto- bzw. polyreaktiver Zellen in der B-Zell-Entwicklung.

Während der B-Zell-Entwicklung werden auto- und polyreaktive B-Zellen eliminiert. Ein erster Kontrollschritt findet im Knochenmark statt und bezieht sich auf frühe unreife B-Zellen. Auto- bzw. Polyreaktive B-Zellen in diesem Stadium können ihre Spezifität durch Rezeptor-Editing verändern (1). Ein zweiter Kontrollschritt zwischen transitionellen und reifen naiven B-Zellen findet im peripheren Blut statt. Transitionelle B-Zellen, die Ag im Blut erkennen werden entweder anerg oder sterben durch Apoptose (2). Ein weiterer Kontrollschritt zwischen reifen naiven B-Zellen und daraus entstehenden IgM-Gedächtnis-B-Zellen wurde erst kürzlich beschrieben und ist noch nicht verstanden (3) [82]. Zahlen im Zentrum der Kreisdiagramme geben die Anzahl der getesteten Antikörper an. Die Werte der schwarzen Kreisabschnitte geben den prozentualen Anteil an auto- bzw. polyreaktiven Zellen an. Die statistische Signifikanz ist unter den Kreisdiagrammen angegeben (Chi²) (verändert nach Tiller, T. und Wardemann, H.).

Interessanterweise besitzen IgG-Gedächtnis-B-Zellen aus gesunden Individuen einen erhöhten Anteil an autoreaktiven und polyreaktiven Zellen (47% bzw. 23%) (Abb.4). Im Gegensatz dazu beträgt der Anteil autoreaktiver IgM-Gedächtnis-B-Zellen gerade einmal 2%. Der Anteil polyreaktiver Zellen liegt mit 1% ebenfalls sehr niedrig [82].

Für Autoimmunerkrankungen wurden ähnliche Studien durchgeführt. Im Vergleich zu naiven B-Zellen gesunder Individuen, wurde in naiven B-Zellen aus SLE-Patienten ein doppelt so hoher Anteil an poly- und selbstreaktiven Zellen gefunden [83]. In einer Studie, die an RA-Patienten durchgeführt wurde, wurden transitionelle B-Zellen (gerade frisch aus dem Knochenmark kommende B-Zellen) mit naiven rezirkulierenden B-Zellen verglichen. Der Anteil an auto- und polyreaktiven naiven B-Zellen war in RA Patienten mit 44% bzw. 19% deutlich höher als in gesunden Individuen [84].

Rheumatoide Arthritis

Symptome und Diagnose

Rheumatoide Arthritis (RA) (Synonym: Chronische Polyarthritits) ist eine chronische, progredient verlaufende Entzündungsreaktion des Bindegewebes, die sich primär in den Gelenken manifestiert. Die Erkrankung kann in jedem Lebensalter auftreten, am häufigsten entwickelt sie sich jedoch zwischen dem 25. und dem 50. Lebensjahr, wobei Frauen etwa dreimal häufiger erkranken als Männer. Im mitteleuropäischen Raum sind etwa 1-2% der Bevölkerung betroffen [85].

Hauptmerkmal der RA ist eine chronische Entzündung der Gelenke, besonders der Schulter-, Ellenbogen-, Hand-, Finger- sowie Kniegelenke. Oft ist auch das Bindegewebe anderer Organe (Augen, Herz, Blutgefäße) in die entzündlichen Prozesse einbezogen. Neben den Schmerzen in den Gelenken besteht durch die systemischen entzündlichen Vorgänge außerdem ein allgemeines Krankheitsgefühl, geprägt von leichtem Fieber, Müdigkeit, Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust. Häufig verläuft die RA in krankheitsaktiven Phasen (Schüben). Dann klingen zwischen den einzelnen Schüben die Beschwerden der Betroffenen wieder ab. Zurück bleiben aber die Gelenkschäden, die sich bei jedem neuen Schub summieren. Bei anderen Betroffenen entwickelt sich die RA über Jahre hinweg langsam und progressiv. Bei diesem Verlauf kommt es nur selten zu Schüben. Zusammen mit den Nebenwirkungen der Medikamente führt die Erkrankung zu erheblichen Einschränkungen der physischen und psychischen Konstitution der Betroffenen. Auch leichte Fälle von RA gehen oft mit einer verringerten Lebenserwartung einher, welcher schwere Infektionen, kardiovaskuläre Krankheiten aber auch Lymphome zugrunde liegen. Bei Fällen mit schwerer RA besteht nur eine 10-Jahres-Überlebensrate von 40% [86,87,88].

Für die Klassifizierung der RA werden üblicherweise die Kriterien des „American College of Rheumatology“ (ACR) herangezogen [89]:

- Morgensteifigkeit in mindestens einem Gelenk für mindestens eine Stunde
- Gelenkentzündungen in mindestens drei verschiedenen Gelenkregionen
- Gelenkentzündungen an Hand- oder Fingergelenken

- Beidseitige Gelenkentzündungen der selben Gelenke beider Körperhälften
- Subkutane Rheumaknoten
- Nachweis von Rheumafaktoren
- Radiologische Veränderungen der Gelenke

Die ACR-Kriterien sind keine Diagnosekriterien im eigentlichen Sinne, sie können allerdings als Diagnosehilfe herangezogen werden. Wenn mindestens vier der sieben Kriterien erfüllt sind (Kriterien 1-4 für mindestens 6 Wochen), gilt es als wahrscheinlich, dass der betreffende Patient unter RA leidet.

Um den Grad der Erkrankung zu beschreiben wird neben dem Erfassen schmerzhafter und geschwollener Gelenke (dazu werden auch bildgebende Verfahren wie Röntgen- oder MTR-Untersuchungen eingesetzt) der DAS28 (engl.: disease activity score, Krankheitsaktivitäts-Wert auf der Basis von 28 rheumaspezifischen Gelenken) bestimmt. Er berechnet sich aus der Anzahl schmerzhafter und geschwollener Gelenke, der BSG (Blutsenkungsgeschwindigkeit) und dem PGA (engl.: patients global assessment) der Patienten. Die Bestimmung des Wertes für das C-reaktive Protein (CRP) liefert unspezifische Hinweise über akut stattfindende entzündliche Vorgänge im Patienten.

Für die Diagnose der RA wird immer häufiger der Autoantikörper-Status der Patienten ermittelt. Hierbei ist das Auftreten von Rheumafaktoren (RF) ein Hinweis, aber kein Beweis für RA, da RF auch bei anderen Erkrankungen und sogar bei gesunden Individuen nachgewiesen werden können [90,91,92]. RF sind Autoantikörper, die gegen den konstanten Anteil von IgG-Antikörpern gerichtet sind. Sie kommen in den Ig-Klassen IgM, IgG und IgA vor. IgM-RF-seropositive Patienten weisen im Vergleich zu seronegativen Patienten oft ein aggressiveres Krankheitsbild mit schlechter Prognose auf. Das Auftreten erhöhter IgA-RF korreliert besonders gut mit der Krankheitsaktivität, Knochenerosion, extraartikulären Symptomen und gibt Hinweise für die notwendige Intensität der Behandlung [93,94,95,96]. Um die Diagnose der RA zu verbessern, wurden in den letzten Jahren weitere Autoantikörper herangezogen. Hierbei sind insbesondere die so genannten ACPA (engl.: anti-citrullinated protein/peptid antibodies) und anti-RA33 Antikörper zu nennen. Zu den ACPA zählen unter anderem Antikörper gegen CCP (cyclic citrullinated peptide) oder MCV (engl.: mutated citrullinated Vimentin, auch bekannt als Sa-Antigen) [97,98,99,100,101,102]. ACPA sind Antikörper, die gegen Proteine bzw. Peptide gerichtet sind, welche die atypische Aminosäure Citrullin besitzen. Citrullin entsteht durch enzymatische Deiminierung von Arginin durch das Enzym Peptidylarginin Deiminase (PAD), das in entzündeten Geweben nachgewiesen werden konnte [103,104]. Die posttranslationelle Modifikation führt offenbar zu einer Änderung der Proteinstruktur und somit zur Generation von Neoepitopen, die vom Immunsystem als fremd erkannt werden. ACPA sind bereits in frühen Phasen der Erkrankung nachweisbar und korrelieren mit der Schwere der Erkrankung. Bei gleichzeitiger Bestimmung von RF und ACPA steigt die Diagnosesicherheit auf bis zu 99% [105]. Als dritt wichtigster diagnostischer Marker zählt der anti-RA33 Antikörper, der das Protein hnRNP A2 erkennt [101,102,106]. Dieses nukleäre Protein wird ubiquitär exprimiert und ist an vielen nukleären Prozessen wie pre-mRNA splicing und mRNA-Transport beteiligt [107]. Nekrotische Prozesse im Entzündungsherd könnten das Protein für B-Zellen erreichbar machen und somit zu einer Immunreaktion führen.

Tab. 1: Diagnostische Profile von RA-assoziierten Autoantikörpern.

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)
RF (>20 IU/ml)	55	89	84
RF (≥50 IU/ml)	45	96	92
ACPA (anti-CCP)	41	98	96
Anti-RA33 (anti-hnRNA A2)	28	90	74

RF (Rheumafaktor), ACPA (engl.: anti-citrullinated protein/peptid antibodies) nach [101]. PPV (engl.: positive predictive value)

Die klinische Relevanz der verschiedenen Autoantikörper wird durch die Sensitivität, die Spezifität und den PPV (engl.: positive predictive value, Wert für eine positive Vorhersage der RA) bestimmt (Tab.1). Dabei gibt die Sensitivität den Anteil an RA-Patienten an, die positiv für den entsprechenden Antikörper sind. Die Spezifität besagt, wie wahrscheinlich ein seronegativer Patient tatsächlich gesund ist. Der PPV gibt den Anteil an positiv getesteten Patienten an, die tatsächlich an RA erkrankt sind.

Neben diesen drei Autoantikörpern können im Serum von RA-Patienten Antikörper gegen Histone [108], Kollagen Typ II [109,110], Calpastatin [111,112] und das Ig-bindende Protein BiP [113] nachgewiesen werden [101,102].

Pathophysiologie

Die Ursache der RA ist unbekannt. Neben autoimmunen Ursachen, bei denen körpereigene Substanzen vom Immunsystem angegriffen werden, werden inapparent verlaufende oder der Erkrankung längere Zeit vorausgehende Infektionen als mögliche Faktoren für die Entstehung der RA vermutet. Weitere Risikofaktoren sind einerseits Umweltfaktoren wie falsche Ernährung, Rauchen und fehlende Bewegung. Andererseits werden immer mehr genetische Krankheitsdispositionen erkannt. Etwa 70% der Erkrankten sind Träger einer Variante des Gens HLA-DRB1 (HLA-DR4, auch unter *shared epitope* (engl.) bekannt), die allerdings auch bei der Normalpopulation in etwa 30% der Individuen gefunden wird [114]. Möglicherweise läuft die immunologische Verarbeitung von bestimmten viralen- bzw. bakteriellen Ag oder auch körpereigenen antigenwirksamen Substanzen wie Kollagen bei Trägern des HLA-DR4-Gens insuffizient ab. Durch Phagozytose dieser Allo- bzw. Auto-AG erfolgt eine Ag-Präsentation zu T-Zellen. Eine erhöhte Zahl von T_H-Zellen und eine verringerte Anzahl von T_{reg}-Zellen führt zu einer gesteigerten Differenzierung von B-Zellen und damit zu einer vermehrten Produktion von Autoantikörpern wie etwa RF. Lokal produzierte RF werden nach Selbstassoziation von Phagozytosezellen aufgenommen. Diese setzen daraufhin Zytokine wie Lymphokine, Interleukin 1 und weitere Entzündungsmediatoren frei, die für die Knorpelzerstörung und Knochenerosion entscheidend sind [115,116,117,118]. Obwohl der Entzündungsprozess weithin als Grund für die Gelenkzerstörung angesehen wird, wurde niemals ein Beweis für die Destruktion von Knochen und Knorpel durch eine immunologische Entzündung erbracht.

Ein alternatives Modell sieht die Gelenkzerstörung vielmehr als einen spezifischen onkologischen Prozess an (engl.: Tumor-like-proliferation). Dabei entsteht durch die Wirkung der Zytokine schubweise aus der pluripotenten Zellmatrix der Synovialmembran (Gelenkinnenhaut) ein geschwulstartiges Gewebe, der Pannus

[119,120]. Die aggressiven Zellverbände, die dabei in den Knorpel und Knochen eindringen exprimieren eine Reihe proteolytischer Enzyme, die sie zur Degradation von Knorpel und Knochen befähigen. Der gefäßfreie Prozess ist kurzlebig, die aggressiven Zellverbände kollabieren innerhalb weniger Tage und werden von Entzündungszellen und Makrophagen resorbiert. Dabei ist die chronische Entzündungsreaktion vielmehr eine Folgereaktion der kollabierenden Zellverbände des Pannus als die Folge einer chronischen Immunreaktion. Da Zytokine die Proliferation der Zellmatrix der Synovialmembran bewirken, könnte eine akute Immunreaktion im Gelenk der Auslöser für die ursprüngliche Wucherung der Synoviozyten gewesen sein.

Die Rolle von B-Zellen im entzündeten Synovialgewebe

Das Vorhandensein von RF und anderen Autoantikörpern weist auf eine grundlegende Rolle von B-Lymphozyten in der Pathogenese der RA hin. Trotz dieses Befundes wurde der Einfluss von B-Zellen in der RA lange Zeit wenig beachtet. Erst die Erfolge, die durch Behandlung von Patienten mit Therapie-resistenter RA mit Rituximab, einem monoklonalen Antikörper mit Spezifität für den B-Zellmarker CD20, erzielt wurden, brachten die B-Lymphozyten in den Fokus klinischer Forschung.

B-Zellen sind nicht nur als Vorläuferzellen für Antikörper produzierende PC von Interesse. Durch Zytokin-Produktion können sie den Krankheitsverlauf maßgeblich beeinflussen und damit Makrophagen und T-Lymphozyten aktivieren. Eine zusätzliche Aufgabe ist Ag-Präsentation was ebenfalls zu T-Zell-Aktivierung führt. B-Zellen mit RF-Spezifität sind sogar in der Lage, T-Lymphozyten polyklonal anzuregen [121]. Zusätzlich können B-Zellen lymphoide Strukturen in nicht-lymphatischen Geweben organisieren, was zur Ausbildung von ektopischen Keimzentren führen kann (tertiäre lymphatische Organe). In solchen ektopischen Keimzentren können B-Zellen ihrerseits aktiviert werden und zu PC differenzieren. Dabei kommt es wie in den Keimzentren von lymphatischen Organen zu somatischer Hypermutation [122,123,124,125,126]. Die deutliche Verbesserung des Krankheitsbildes, das bei RA-Patienten nach B-Zell-Depletion beobachtet wird, unterstreicht die wichtige Funktion der B-Zellen für die Pathogenese der RA.

Die gesunde Gelenkinnenhaut (Synovialis, Synovialmembran) besteht aus Zellen (Synovialozyten), die die Gelenkflüssigkeit produzieren und ist nur wenige Zellschichten dick (Abb.5). Während des rheumatoiden Entzündungsprozesses wandern permanent Entzündungszellen in die Synovialis ein. Dies führt zur Bildung eines entzündlichen Synovialgewebes (SG) und später zur Ausbildung eines Pannus, der die eigentliche Zerstörung des Gelenks bewirkt.

Die entzündlichen SG verschiedener Patienten zeigen in Hinblick auf die Organisation der lymphoiden Infiltrate eine hohe Heterogenität. In den meisten Fällen (etwa 50%) verteilen sich die Lymphozyten diffus ohne nennenswerte Ansammlungen im SG [127]. In anderen RA-Patienten kommt es zu Anhäufungen von Lymphozyten, entweder als follikelähnliche Strukturen mit ektopischen Keimzentren (tertiäre lymphatische Organe), oder als lymphozytäre Infiltrate ohne ektopische Keimzentren (B/T-Zell-Infiltrate). Nur etwa 2-5% der Patienten besitzen ektopische Keimzentren. In ihnen findet massive Zellproliferation, somatische Hypermutation und Differenzierung zu PC statt [122,123,124,125].

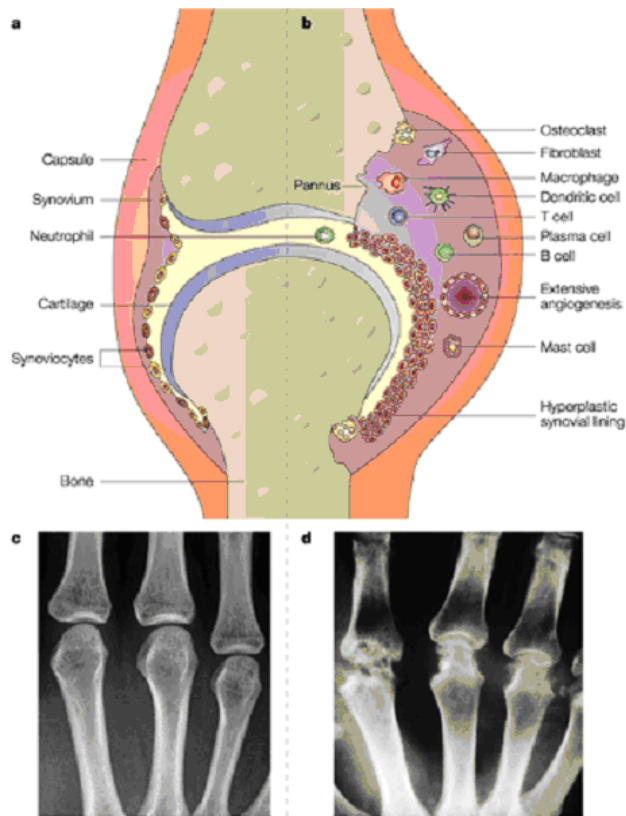


Abb. 5: Schematischer Aufbau gesunder Gelenke und Veränderungen im rheumatischen Gelenk.

A) Gelenke bestehen aus zwei benachbarten Knochen, die an ihren Enden eine Knorpelschicht (cartilage) tragen. Sie werden durch den Gelenkspalt getrennt und von einer Synovialmembran (Synovium) und einer Kapsel (capsule) umschlossen. Im darunterliegenden sublining Bindegewebe befinden sich nur wenige mononukleäre Zellen. **B)** Während der RA kommt es zu entzündlichen Prozessen in der Synovialmembran und zur Einwanderung und lokalen Aktivierung von mononukleären Zellen. Die Folge ist die Bildung eines Pannus, der den Knochen zerstört. **C)** Röntgen-Aufnahme einer gesunden Hand. Die Gelenkspalten sind deutlich ausgeprägt. **D)** Als Folge der Knochen- und Knorpelzerstörung haben sich die Gelenkspalten angenähert oder sind ganz verschwunden (Knochenerosion). [128]

Neben B-Zellen findet man auch PC in unterschiedlicher Anzahl und Organisation im SG. Häufig kann man PC als einen Ring um lymphozytäre Infiltrate oder ektopische Keimzentren erkennen (Infiltrat-assoziierte PC, Ass-PC). Daneben findet man PC organisiert in dicht gepackten Aggregaten entlang der Gefäße (vasculäre PC, Vas-PC) und als diffus verteilte PC im Gewebe.

In neueren Untersuchungen wurde gezeigt, dass B-Zellen nicht nur wichtige Immunzellen in der Entzündungsreaktion sind, sondern direkt zur Chronizität der Entzündung beitragen [129,130]. In den Studien wurden RA Patienten mit dem B-Zell-depletierenden Antikörper Rituximab behandelt und das SG vor bzw. 4 und 16 Wochen nach der Behandlung untersucht. Dabei korrelierte das Vorhandensein von T-Zellen, Makrophagen und PC mit dem der B-Zellen. Obwohl 16 Wochen nach Rituximab-Behandlung in einigen Patienten noch große Mengen PC im SG vorhanden waren, zeigt die Studie eindrucksvoll, dass B-Zellen maßgeblich am Erhalt der synovialen Infiltrate und des Autoantikörper-Titers mitwirken [129,130].

Fragestellung

B-Zellen besitzen eine immer deutlicher werdende Schlüsselfunktion im synovialen Entzündungsprozess. Dennoch ist über die im SG stattfindende B-Zell-Antwort nicht viel bekannt. Arbeiten, die sich mit dieser Frage beschäftigten, untersuchten entweder synoviale Gesamt-B-Zellen unabhängig von der B-Zell-Population [131,132,133] oder fokussierten sich auf B-Zellen in ektopischen Keimzentren [123,124,126]. Dabei konnte gezeigt werden, dass in ektopischen Keimzentren sowohl naive, als auch Gedächtnis-B-Zellen aktiviert werden und die Prozesse der somatischen Hypermutation und des Klassenwechsels durchführen können.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der B-Zell-Antwort in SG, die keine ektopischen Keimzentren ausbilden. Es soll untersucht werden, ob in solchen Geweben sowohl naive als auch Gedächtnis-B-Zellen einwandern und ob beide B-Zell-Populationen lokal aktiviert werden können, ob die Aktivierung Ag-spezifisch ist und ob sie zur PC-Differenzierung führt. Desweiteren soll geklärt werden, ob es während des Differenzierungsprozesses zu somatischer Hypermutation und zu Klassenwechsel kommt.

Um zu verstehen, welche Ag zur B-Zell-Aktivierung im SG führen, soll die Spezifität synovialer B-Zellen und PC gegen verschiedene Auto-Ag ermittelt werden. Für einen Vergleich der synovialen B-Zell- und PC-Populationen von RA-Patienten mit denen von gesunden Individuen, soll der Anteil an auto- und polyreaktiven B-Lymphozyten bestimmt werden. Über die Identifizierung von B-Lymphozyten mit Spezifität gegen Parodontitis-auslösende bzw. kommensale Bakterienstämme soll der Einfluss von Parodontitiseimen auf die RA untersucht werden.

Ergebnisse

Heterogener Phänotyp von Synovialgeweben

Um die B-Zell-Antwort im Synovium von Patienten mit RA zu untersuchen, wurden die SG von 16 Patienten histologisch charakterisiert. B-Zellen wurden mit CD20-spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Färbung von PC erfolgte mit dem PC-spezifischen Antikörper Wue-1 [123]. Gefäße wurden mit anti-CD31-Antikörpern sichtbar gemacht. Die SG der verschiedenen Patienten zeigten eine hohe Heterogenität. Die Mehrzahl der Patienten (56%) besaß keine oder nur sehr diffus verteilte B-Zellen bzw. PC. Von den Biopsien, in denen lymphozytäre Infiltrate nachgewiesen werden konnten, wurden drei Gruppen unterschieden (Abb.6 und Tab.2). Im SG der Gruppe I (Patient B0002) wurden nur PC, jedoch keine oder nur sehr wenig B-Zellen detektiert (Abb.6). Diese PC waren stets mit Blutgefäßen assoziiert (vasculäre PC, Vas-PC) (Abb.7). Patienten der Gruppe II besaßen Infiltrate aus B- und T-Zellen (Patient B0029). Die Größe dieser Infiltrate entsprach etwa der von Follikeln in sekundären lymphatischen Organen. Neben Vas-PC entlang der Gefäße besaßen diese Patienten eine Schicht aus PC, die ringförmig um die lymphozytären Infiltrate herum angeordnet war (Infiltrat-assoziierte PC, Ass-PC) (Abb.6 und Abb.7).

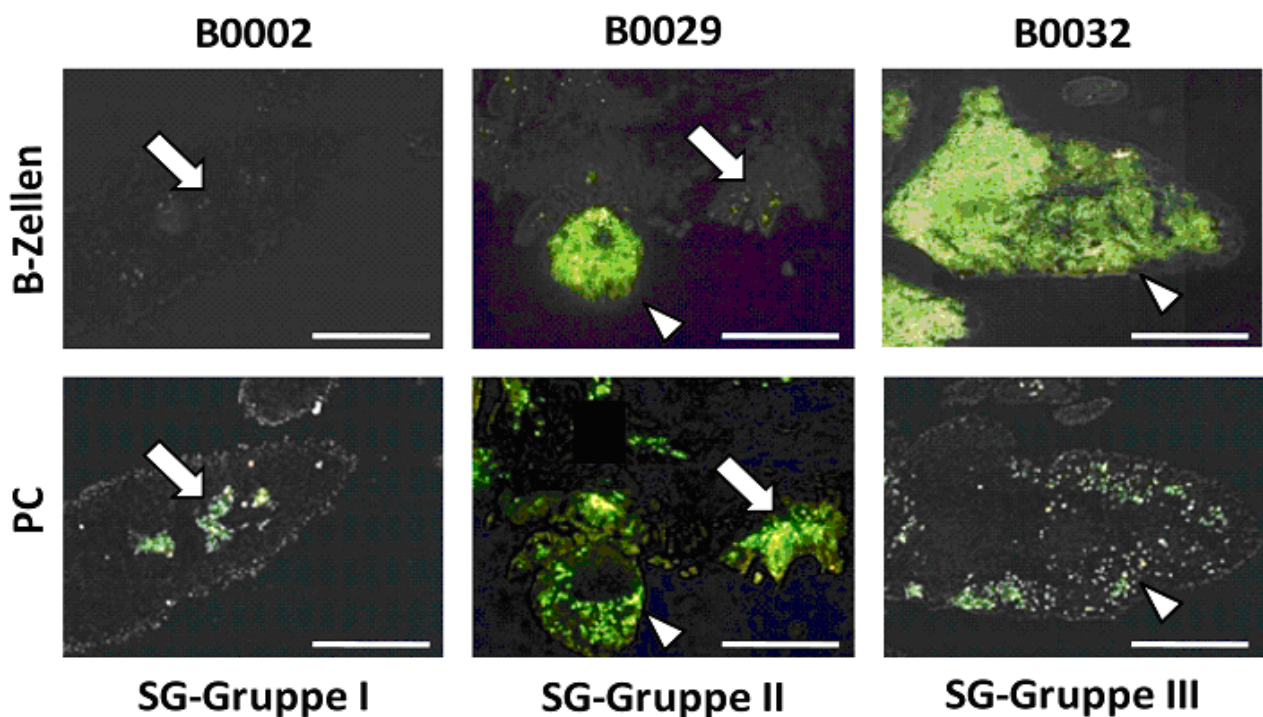


Abb. 6: Phänotyp der Synovialgewebe verschiedener RA-Patienten durch Histologie.

Konsequente Schnitte des SG der Patienten B0002 (SG-Gruppe I), B0029 (SG-Gruppe II) und B0032 (SG-Gruppe III) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen B-Zellen (anti-CD20) und PC (Wue-1) angefärbt. Weiße Pfeile: Vasculäre PC (Vas-PC). Weiße Pfeilspitzen: Infiltrat-assoziierte PC (Ass-PC). Weißer Balken: 100µm.

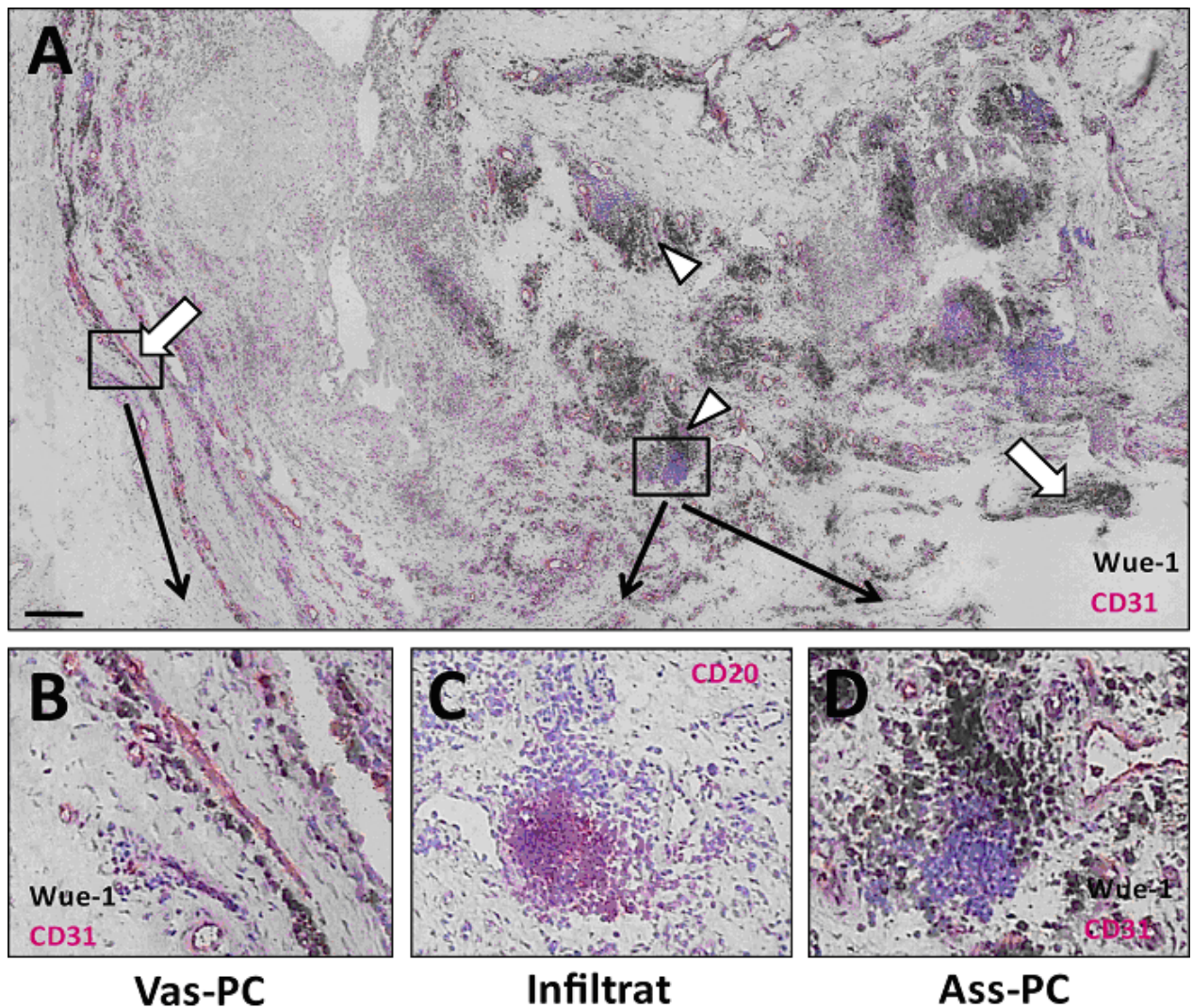


Abb. 7: Das Synovialgewebe besitzt zwei Populationen von PC.

Konsequente Schnitte des SG von Patient B0029 wurde mit spezifischen Antikörpern gegen PC (Wue-1, schwarz) und Endothelzellen (CD31, rot) (A, B und D), B-Zellen (CD20, rot) (C) angefärbt. Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gefärbt (blau). **A)** Übersicht des SG von Patient B0029. Weiße Pfeile: Vasculäre PC. Weiße Pfeilspitzen: Infiltrat-assoziierte PC. Schwarzer Balken: 100µm. Schwarze Vierecke geben den Ausschnitt der Vergrößerungen B bis D an. **B)** Vasculäre PC (Vas-PC) (schwarz) entlang von Blutgefäßen (rot). **C)** B-Zell-Infiltrat (rot). **D)** Infiltrat-assoziierte PC (Ass-PC) (schwarz) um lymphozytäre Infiltrate

Im Gegensatz dazu waren die B/T-Zell-Infiltrate der SG der Gruppe III (Patient B0032) um einiges größer als Follikel in sekundären lymphatischen Organen (Abb.6). Gleichzeitig war die Schicht aus Ass-PC um die Infiltrate viel dünner und die Anzahl Vas-PC stark reduziert. Das SG war in hohem Maße übersät von lymphozytären Zellansammlungen. Die Anzahl proliferierender Zellen war in den Infiltraten aller Patienten sehr gering, was gegen eine generelle Aktivierung von synovialen B-Zellen spricht. In keinem der analysierten Patienten konnten ektopische Keimzentren identifiziert werden (keine FDC-Färbung, keine Zone proliferierender Zellen, keine Segregation von B- und T-Zellen).

Zusammengenommen zeigt die histologische Charakterisierung von SG verschiedener Patienten ein sehr heterogenes Bild. Während in etwa der Hälfte der analysierten SG keine Anzeichen von lymphozytären Infiltraten zu finden waren, zeigten andere Patienten Ansammlungen von B-, T-Zellen und PC in unterschiedlichen Ausprägungen.

Immunantwort im Synovialgewebe

Um die synoviale B-Zell-Antwort zu untersuchen, wurden B-Zellen und PC mittels Mikrodissektion (engl.: laser capture microdissection, LCM) aus den SG isoliert und anschließend eine Sequenzanalyse der rearrangierten Ig-Gene durchgeführt. Die Mikrodissektion erfolgte an SG von drei RA-Patienten (B0002, B0029 und B0032, Patienteninformationen: Tab.16). Dabei stammt das SG von Patient B0002 aus der Gruppe I, dass von B0029 aus der Gruppe II und das SG von Patient B0032 aus der Gruppe III (Tab.2). Der Ansatz der Mikrodissektion wurde gewählt, weil dadurch zwischen Ass-PC und Vas-PC unterschieden werden konnte. Beide PC-Populationen wurden nur durch ihre histologische Lokalisation charakterisiert, nicht jedoch durch die Expression ihrer Oberflächenmarker.

Synoviale B-Zellen wurden aus elf unterschiedlichen B/T-Zell-Infiltraten von zwei Patienten (B0029 und B0032) gewonnen (Tab.2). Da es unmöglich war, in den dichten lymphozytären Zellansammlungen Einzelzellen zu isolieren, wurden aus jedem Infiltrat sechs bis acht benachbarte Bereiche bestehend aus je zehn bis 20 B-Zellen mikrodissektiert. Zusätzlich wurden die korrespondierenden Ass-PC von sieben dieser Infiltrate entnommen. Zum Vergleich wurden Vas-PC von allen drei Patienten isoliert. Die PC wurden als Gruppen von ca. zehn Einzelzellen mikrodissektiert. Die Anzahl der untersuchten Bereiche ist in Tab.2 zusammengefasst. Aus den gewonnenen Proben wurde RNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden die Ig-Gene amplifiziert und sequenziert. Auf diese Art konnten 393 unterschiedliche VDJ-Rearrangements gewonnen und analysiert werden (Tab.2).

Vergleichende Sequenzanalyse von mikrodissektierten B-Zellen und PC

Das V_H-Gen-Repertoire der mikrodissektierten Zellpopulationen wurde mit dem Repertoire von naiven B-Zellen aus dem Blut von gesunden Individuen verglichen (Standard-Repertoire: Tab.17). Dabei konnte im Repertoire der synovialen B-Zellen kein Unterschied festgestellt werden (Abb.8A).

Tab. 2: Überblick über die Anzahl mikrodissektierter Regionen und erhaltener Sequenzen.

Patient	SG-Gruppe	Population	Anzahl LCM Regionen	Anzahl Caps*	Anzahl Sequenzen [#]	Anzahl VDJ [§]
B0002	I	Vas-PC	7	22	157	33
B0029	II	B-Zellen	2	14	139	55
		Ass-PC	2	18	142	48
		Vas-PC	6	38	310	85
B0032	III	B-Zellen	9	25	139	67
		Ass-PC	5	18	173	61
		Vas-PC	6	12	93	44
			34	129	1153	393

* Anzahl unabhängig mikrodissektierter Bereiche (Caps). [#] Anzahl gewonnener Sequenzen aus den mikrodissektierten Caps.

[§]Anzahl unterschiedliche VDJ-Rearrangements in den analysierten Sequenzen.

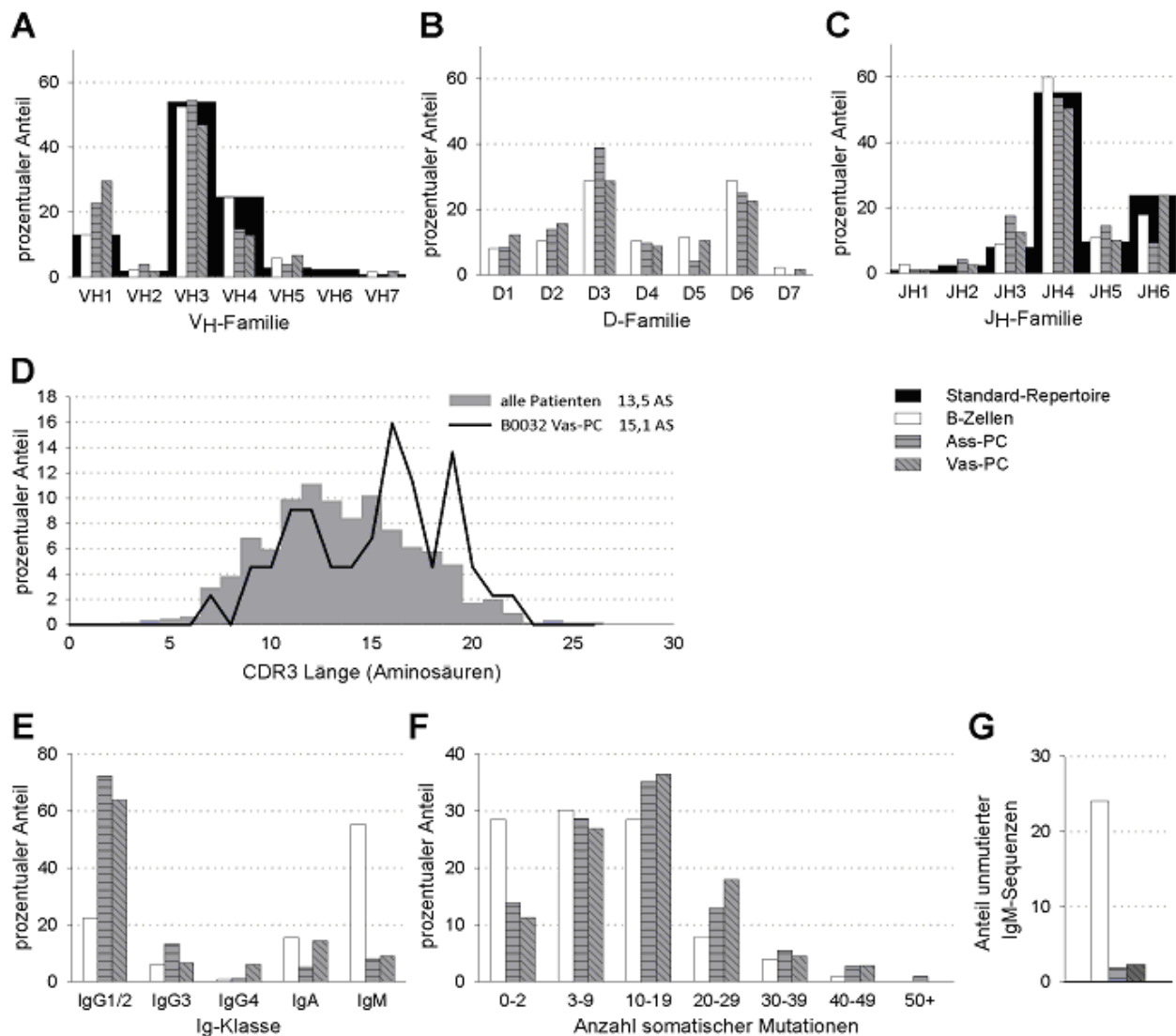


Abb. 8: Sequenzanalyse mikrodisektierter B-Zellen und PC der Patienten B0002, B0029 und B0032.

B-Zellen: weiß, Ass-PC: grau quergestreift; Vas-PC: grau diagonal gestreift. **A)** V_H-Gen-Repertoire. Das Standard-Repertoire wurde von [134] entnommen. Das Repertoire der Vas-PC unterschied sich signifikant vom Standard-Repertoire (χ^2 : $p < 0,001$). **B)** D-Gen-Repertoire. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den mikrodisektierten Populationen (χ^2). **C)** J_H-Gen-Repertoire. Das Standard-Repertoire wurde von [134] entnommen. Das Repertoire der Ass-PC unterschied sich signifikant vom Standard-Repertoire (χ^2 : $p = 0,01$) und vom Repertoire der synovialen B-Zellen (χ^2 : $p = 0,035$). **D)** Prozentualer Anteil der CDR3 Länge der PC aller untersuchten Patienten und der Vas-PC von Patient B0032. Keine signifikanten Unterschiede (χ^2 : $p = 0,505$). **E)** Prozentualer Anteil der Ig-Isotypen. Alle drei Populationen unterschieden sich signifikant (χ^2 : $p \leq 0,015$). **F)** Prozentualer Anteil der Anzahl an Mutationen. Als unmutiert galten Sequenzen mit bis zu 2 Mutationen. Naive B-Zellen unterschieden sich signifikant von Gedächtnis-B-Zellen und PC (Mann-Whitney: $p < 0,001$). **G)** Anteil unmutierter Sequenzen mit IgM schwerer Kette. Naive B-Zellen unterschieden sich signifikant von Gedächtnis-B-Zellen und PC (χ^2 : $p < 0,001$).

Im Gegensatz dazu war das V_H-Gen-Repertoire synovialer PC im Vergleich zum Standard-Repertoire verändert. Die mikrodisektierten PC-Populationen der Patienten B0002, B0029 und B0032 besaßen eine Überrepräsentation von V_H1-exprimierenden PC und eine Unterrepräsentation von Zellen der V_H4-Familie (Abb.8A). Für die Vas-PC war sowohl die Veränderung zum Standard-Repertoire als auch die Veränderung zum Repertoire mikrodisektierter synovialer B-Zellen signifikant (χ^2 : $p < 0,001$). Sowohl B-Zellen als auch PC wiesen keine Unterschiede im Gebrauch der D-Segmente auf (Abb.8B). In der Expression der J_H-Gene besaßen

die Ass-PC signifikante Veränderungen zum Standard-Repertoire gesunder Individuen (χ^2 : $p=0,01$) (Abb.8C). Die Analyse der CDR3-Regionen der VDJ-Rearrangements der synovialen B-Zellen und PC zeigte keine Unterschiede im Gebrauch von geladenen und polaren Aminosäuren (Daten nicht gezeigt). Die Länge der CDR3-Regionen war in B-Zellen und PC vergleichbar. Einzig die V_H -Sequenzen der Vas-PC von Patient B0032 zeigten eine Tendenz zu längeren CDR3-Bereichen. In dieser Population lag die durchschnittliche Länge der CDR3-Region bei 15,1 Aminosäuren (Durchschnitt aller Sequenzen: 13,5 Aminosäuren) (Abb.8D).

Von den mikrodisssektierten B-Zellen besaßen 56% einen BCR der IgM-Klasse, 30% einen des IgG-Isotyps und 14% exprimierten IgA. (Abb.8E). Im Gegensatz dazu exprimieren die Mehrzahl der synovialen PC Antikörper vom IgG-Isotyp (ca. 80%). Die Anteile der einzelnen Ig-Isotypen synovialer PC spiegelten den Antikörpertiter wieder, der für das Blut gesunder Individuen beschrieben wurde [5].

Die Mutationsfrequenz synovialer B-Zellen lag bei 11,5 Mutationen pro V_H -Segment (Abb.8F). Von den Zellen, die IgM exprimierten, waren etwa 50% unmutiert (0-2 Mutationen) und wurden somit als naive B-Zellen definiert (24% unmutierte IgM-exprimierende Zellen) (Abb.8G). Im Gegensatz dazu exprimierten 90% der PC mutierte V_H -Gene (Abb.8F). Die Mehrzahl der unmutierten PC besaß eine IgG oder IgA schwere Kette, so dass nur etwa 1,5% der synovialen PC unmutierte IgM Antikörper sezernierten (Abb.8G). Die durchschnittliche Anzahl somatischer Mutationen in den PC-Populationen war abhängig vom Patient. Die PC von Patient B0029 besaßen eine mittlere Mutationsfrequenz von 10,1 Mutationen pro V_H -Segment. Die PC-Mutationsfrequenzen der Patienten B0002 und B0032 waren vergleichbar und lagen bei 17,1 bzw. 17,8 Mutationen pro V_H -Segment. Die hier gewonnenen Daten zeigen, dass naive B-Zellen dazu in der Lage sind, in das SG einzuwandern. Der Vergleich der V_H -Gen-Repertoires und der Länge der CDR3-Regionen synovialer B-Zellen mit naiven B-Zellen aus gesunden Individuen zeigte keine Unterschiede. Im Gegensatz dazu besaßen synoviale PC ein selektiertes V_H -Gen-Repertoire. Das V_H -Gen-Repertoire und die CDR3-Länge von Vas-PC waren tendenziell stärker verändert als in Ass-PC.

Vergleichende Sequenzanalyse von sortierten B-Zellen und PC

Um das Repertoire von einzelnen synovialen B-Lymphozyten zu untersuchen wurden B-Zellen und PC enzymatisch verdauten SG durchflusszytometrisch sortiert. Die Methode erlaubte es, naive und Gedächtnis-B-Zellen getrennt zu untersuchen. Jedoch war eine Unterscheidung zwischen Ass-PC und Vas-PC nicht mehr möglich, da beide Populationen nur histologisch differenziert wurden, da bisher keine Oberflächenmarker für ihre Unterscheidung beschrieben wurden sind. Zur Gewinnung der Zellen wurden die SG von vier RA-Patienten (B0112, B0114, B0116 und B0117; Patienteninformationen: Tab.16) enzymatisch mit Kollagenase D verdaut.

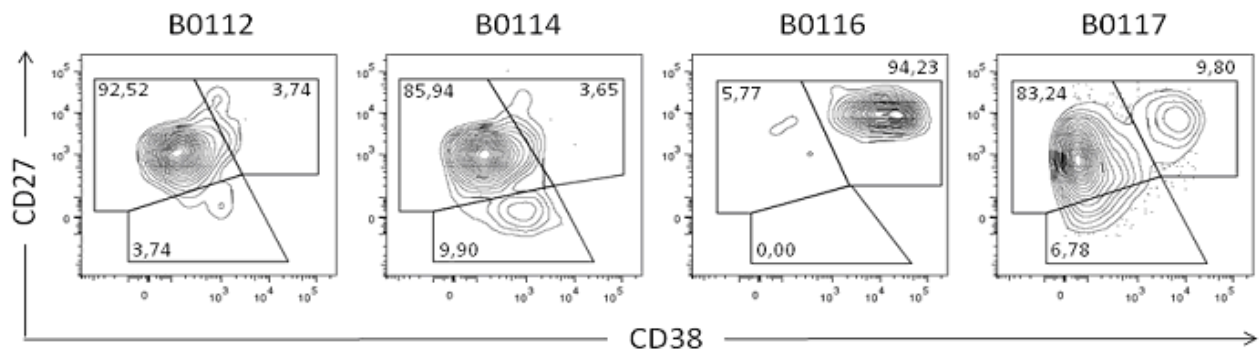


Abb. 9: Heterogener Phänotyp der Synovialgewebe verschiedener Patienten durch Durchflusszytometrie.

Die SG der Patienten B0112, B0114, B0116 und B0117 wurden mit Kollagenase verdaut. Anschließend wurde die Zellsuspension durchflusszytometrisch untersucht, um den Anteil naiver B-Zellen ($CD27^{neg}$, $CD38^{neg}$), Gedächtnis-B-Zellen ($CD27^{pos}$, $CD38^{neg}$) und PC ($CD27^{pos}$, $CD38^{pos}$) zu bestimmen.

Die Unterscheidung von naiven B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen und PC erfolgte anhand der Expression von CD19, CD27 und CD38. Das Verhältnis der drei Zellpopulationen war in den Patienten B0112, B0114 und B0117 annähernd gleich (Abb.9). Die markanteste Population wurde von $CD27^{pos}$, $CD38^{neg}$ Gedächtnis-B-Zellen gebildet (83-93%), gefolgt von $CD27^{pos}$, $CD38^{pos}$ PC (3-10%) und $CD27^{neg}$, $CD38^{neg}$ naiven B-Zellen (0-10%). Alle drei Patienten wurden histologisch der SG-Gruppe II zugeordnet (Daten nicht gezeigt) (Tab.3). Im Gegensatz dazu besaß Patient B0116 (SG-Gruppe I) sehr viele PC (94%) und nur wenig B-Zellen (6%). Die durchflusszytometrischen Daten bestätigten den histologischen Befund, dass SG einen heterogenen Phänotyp besitzen (Abb.6).

Von den sortierten Einzelzellen der Patienten B0112 bis B0117 wurden die Gene der schweren und leichten Ig-Kette amplifiziert und sequenziert. Die Anzahl untersuchter Ig-Sequenzen der schweren und leichten Ig-Ketten sind in Tab.3 zusammengefasst.

Das V_H -Gen-Repertoire der sortierten Gedächtnis-B-Zellen unterschied sich signifikant vom Repertoire gesunder Individuen (χ^2 : $p=0,042$) (Abb.10A). Verglichen mit dem Standard-Repertoire wurde eine Unterrepräsentation von Sequenzen der V_H3 -Familie und eine Überrepräsentation von Mitgliedern der V_H4 -Familie beobachtet. Im Gebrauch der D-Segmente konnten in keiner der drei Populationen signifikante Unterschiede gegenüber gesunden Individuen festgestellt werden (Abb.10B).

Tab. 3: Überblick über die Anzahl durchflusszytometrisch sortierter Zellen und Sequenzen.

Patient	SG-Gruppe	Population	Anzahl Zellen*	Anzahl Sequenzen [#]	V_H - V_HDJ_H [§]	Anzahl Sequenzen [#]	V_L - V_LJ_L [§]
B0112	II	PC	46	19	19	9	9
B0114	II	naive B-Zellen	96	46	46	35	35
		Gedächtnis-B-Zellen	96	40	40	32	32
		PC	96	72	71	51	51
B0116	I	PC	96	55	42	34	26
B0117	II	naive B-Zellen	96	31	31	19	19
		Gedächtnis-B-Zellen	96	30	30	21	21
		PC	96	60	60	36	36
			718	353	345	237	229

* Anzahl sortierter Einzelzellen. [#] Anzahl gewonnener Sequenzen. [§] Anzahl unterschiedliche Rearrangements in den analysierten Sequenzen.

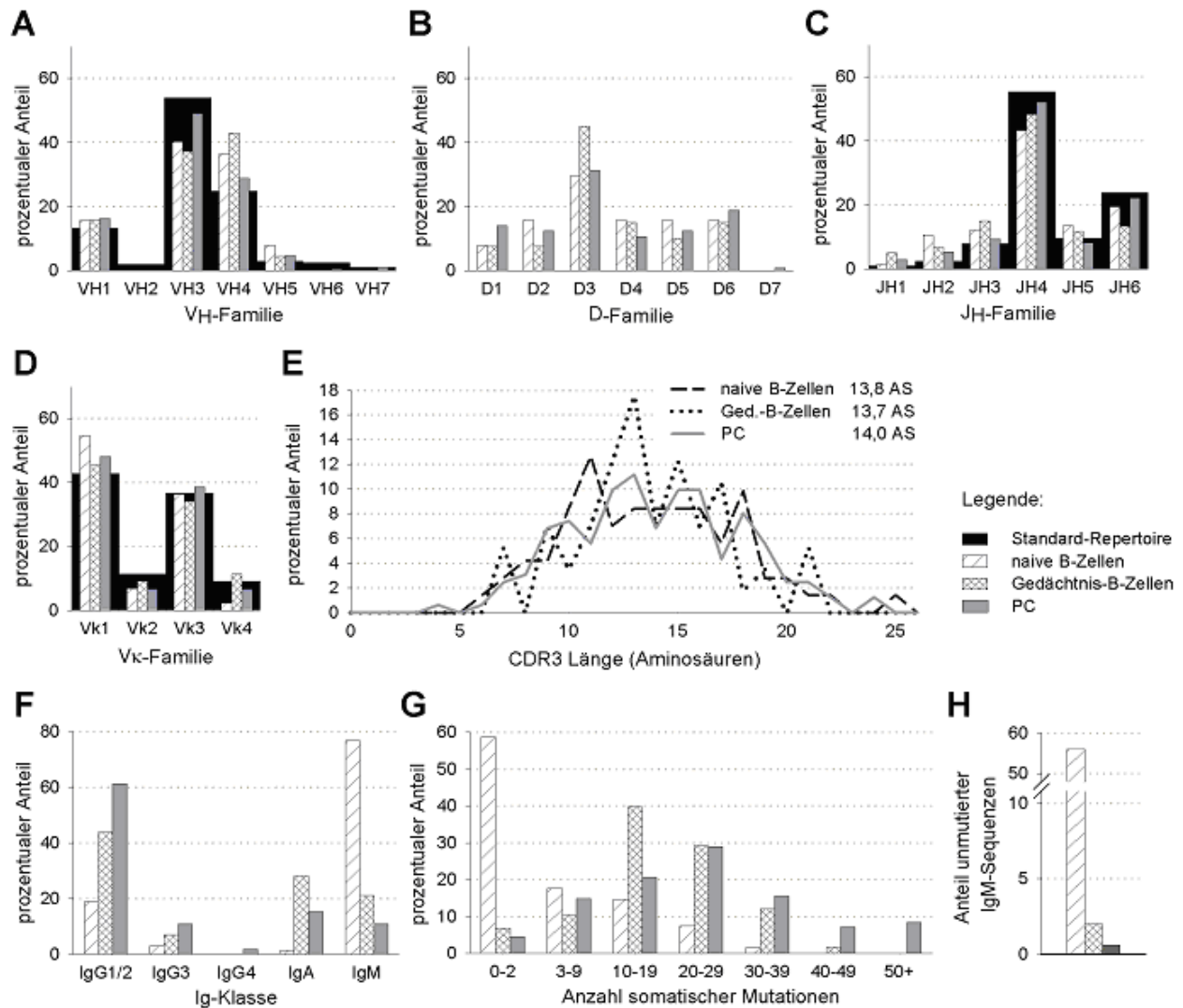


Abb. 10: Sequenzanalyse durchflusszytometrisch sortierter Einzelzellen der Patienten B0112, B0114, B0116 und B0117.

Naive B-Zellen: weiß diagonal gestreift; Gedächtnis-B-Zellen: weiß karogemustert; PC: grau **A**) V_H-Gen- Repertoire. Das Standard-Repertoire wurde von [134] entnommen. Das Repertoire der Gedächtnis-B-Zellen unterschied sich signifikant vom Standard-Repertoire (χ^2 : $p=0,042$). **B**) D-Gen-Repertoire. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den sortierten Populationen (χ^2). **C**) J_H-Gen-Repertoire. Das Standard-Repertoire wurde von [134] entnommen. Das Repertoire der Gedächtnis-B-Zellen unterschied sich signifikant vom Standard-Repertoire (χ^2 : $p=0,034$). **D**) V_K-Gen-Repertoire. Das Standard-Repertoire wurde von [135] entnommen. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den sortierten Populationen (χ^2). **E**) prozentualer Anteil der CDR3 Länge und durchschnittliche Anzahl an Aminosäuren der CDR3-Region der drei Zellpopulationen. **F**) Prozentualer Anteil der Ig-Isotypen. Alle drei Populationen unterschieden sich signifikant (χ^2 : $p \leq 0,026$). **G**) Prozentualer Anteil der Anzahl an Mutationen. Als unmutiert galten Sequenzen mit bis zu 2 Mutationen. Alle drei Populationen waren signifikant unterschiedlich zueinander (Mann-Whitney: $p < 0,001$). **H**) Anteil unmutierter Sequenzen mit IgM schwerer Kette. Naive B-Zellen unterschieden sich signifikant von Gedächtnis-B-Zellen und PC (χ^2 : $p < 0,001$).

Analog zum V_H-Gen-Repertoire unterschied sich das J_H-Gen-Repertoire der sortierten Gedächtnis-B-Zellen signifikant vom J_H-Gen-Repertoire gesunder Probanden (χ^2 : $p=0,034$). Die Repertoires der V_K-leichten Kette der drei sortierten Populationen unterschieden sich nicht vom V_K-Repertoire gesunder Individuen (Standard V_K-Repertoire: Tab.18) (Abb.10D). Das V_λ-Repertoire konnte nicht analysiert werden, da von den 229 analysierten Rearrangements der leichten Ketten lediglich 20 eine λ-leichte Kette exprimierten. Die geringe Anzahl λ-exprimierender Zellen ließ keine statistische Aussagen zu, weist jedoch auf eine starke Selektion zu κ-exprimierenden Zellen im SG hin.

Die durchschnittliche Länge der CDR3-Region war in allen drei Populationen ähnlich (Abb.10E). Von den sortierten naiven B-Zellen exprimierten 77% einen IgM-BCR (Abb.10F). Im Gegensatz dazu exprimierten Gedächtnis-B-Zellen und PC hauptsächlich Ig der IgG- und IgA-Klasse.

Die Mehrheit der naiven B-Zellen besaß Keimbahn-Ig. Dennoch waren 42% der sortierten naiven B-Zellen mutiert (Abb.10G).

Die Mutationsfrequenz naiver B-Zellen lag bei 6,7 Mutationen pro V_H-Segment (15,4 Mutationen pro mutierter Sequenz). Von den naiven-B-Zellen, die IgM-Rezeptoren exprimierten, waren 56% unmutiert (Abb.10H). Die Mutationsfrequenz synovialer Gedächtnis-B-Zellen lag bei 17,1 Mutationen pro Sequenz und war unabhängig vom Isotyp des BCR. Die Mutationsfrequenz von PC war stark abhängig vom Patienten. Die Patienten B0112 und B0117 besaßen, ähnlich der Patienten B0002 und B0032, durchschnittlich 20,5 bzw. 20,4 Mutationen im V_H-Gen. Höhere Mutationsraten wurden in den beiden Patienten B0114 (26,1 Mutationen pro V_H-Segment) und B0116 (30,4 Mutationen pro V_H-Segment) gefunden. In den 56 Rearrangements von Patient B0116 konnten drei Sequenzen identifiziert werden, die mehr als 70 Mutationen aufwiesen (Beispiele in Abb.13). Der Anteil an unmutierten IgM-exprimierenden Gedächtnis-B-Zellen und PC lag bei unter 2% (Abb.10H)

Zusammengenommen zeigt die Repertoireanalyse der sortierten B-Lymphozyten, dass neben PC auch Gedächtnis-B-Zellen ein selektioniertes Repertoire exprimieren. Somit scheinen die im SG vorkommenden Ag-erfahrenen B-Zell-Populationen für bestimmte Ag selektioniert worden zu sein.

Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen im Synovialgewebe

Klonale Expansion im Synovialgewebe

In der Analyse der Repertoires der mikrodisssektierten und durchflusszytometrisch sortierten B-Lymphozyten wurden Sequenzen mit identischen Rearrangements identifiziert. Diese Zellen wurden als Nachkommen von aktivierten und klonal expandierten B-Zellen betrachtet und werden im Folgenden als Klone bezeichnet.

Aus Patient B0002 konnten acht Klone (8 aus 33, 24,2%) isoliert werden (Abb.11A). Patient B0029 besaß 31 (31 aus 188, 16,4%) (Abb.12) und Patient B0032 fünf repetitive Klone (5 aus 172, 2,9%). In den 72 PC, die von Patient B0114 sequenziert wurden, konnte ein Rearrangement in zwei PC gefunden werden. Bemerkenswerterweise besaß der Patient B0116 eine unerwartet hohe Anzahl an Klonen. Von den 55 analysierten Einzelzellen konnten sechs Klone identifiziert werden. Zwei der Klone wurden in je zwei PC nachgewiesen. Ein Klon wurde aus drei individuellen PC isoliert und drei weitere Klone konnten aus je vier Zellen sequenziert werden (Beispiele in Abb.13).

Insgesamt gehörten 19 der 55 Sequenzen zu klonal verwandten Zellen (34,5%) und sechs der 42 Rearrangements waren auf expandierte Klone zurückzuführen (14,3%). Die meisten klonal verwandten Zellen stammten aus den verschiedenen Vas-PC-Regionen sowie aus den B/T-Zell-Infiltraten und ihren korrespondierenden Ass-PC (Abb.11A). Innerhalb der B/T-Zell-Infiltrate konnten nur zwei Klone identifiziert werden. In den durchflusszytometrisch sortierten naiven und Gedächtnis-B-Zellen wurden keine klonal verwandten Zellen identifiziert. Zusammen mit der geringe Anzahl an klonal verwandten Zellen innerhalb der

B/T-Zell-Infiltrate zeigte dies, dass die Zusammensetzung der B-Zellen in den Infiltraten im Gegensatz zu der in den PC-Bereichen sehr heterogen ist.

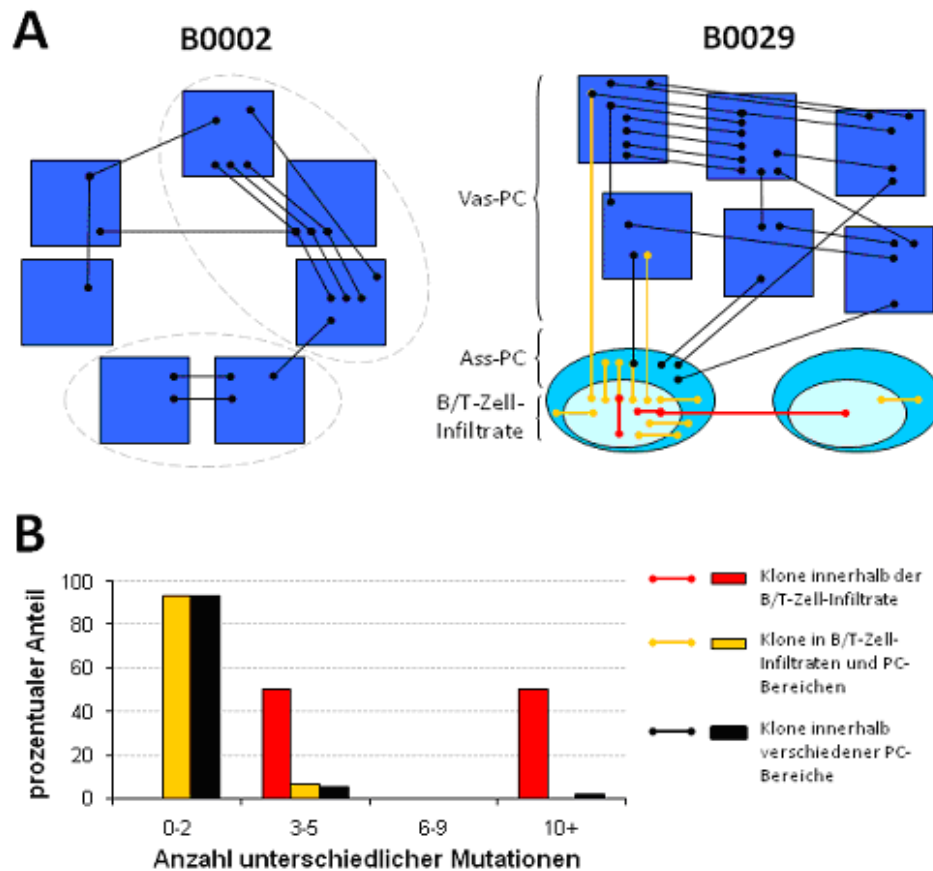


Abb. 11: Lokalisation und Diversifizierung klonal verwandter B-Lymphozyten.

A) Lokalisation klonal verwandter Zellen der Patienten B0002 und B0029. Dunkelblaue Quadrate symbolisieren Bereiche mikrodisektierter Vas-PC. Blaue Ovale symbolisieren Infiltrate (hellblau) mit ihren korrespondierenden Ass-PC (blau). Gestrichelte Ovale in Patient B0002 deuten an, dass die mikrodisektierten Vas-PC aus derselben PC-Region auf unterschiedlichen konsekutiven Schnitten stammen. Die Lage klonal verwandter Zellen wurde mit farbigen Linien dargestellt. Rot: Klon innerhalb der B/T-Zell-Infiltrate. Orange: Klon in B/T-Zell-Infiltraten und PC-Bereichen. Schwarz: Klon innerhalb verschiedener PC-Bereichen. **B)** Prozentualer Anteil von Klonen mit unterschiedlicher Mutationsanzahl. Rot: Klon innerhalb der B/T-Zell-Infiltrate. Orange: Klon in B/T-Zell-Infiltraten und PC-Bereichen. Schwarz: Klon innerhalb verschiedener PC-Bereiche.

Um zu untersuchen, ob es auch in Geweben, die keine ektopischen Keimzentren besitzen zur SHM kommen kann, wurde die Anzahl der Mutationen von klonal verwandten Zellen innerhalb der B/T-Zell-Infiltrate, zwischen den B/T-Zell-Infiltraten und den PC-Bereichen sowie innerhalb verschiedener PC-Regionen gezählt (Abb.11A). Falls es nach der B-Zell-Aktivierung zu SHM kommt, würden PC eine höhere Anzahl an Mutationen tragen als die klonal verwandten B-Zellen in den B/T-Zell-Infiltraten. Mehr als 90% der Klonen aus verschiedenen PC-Bereichen und der Klonen, die aus B/T-Zell-Infiltraten und PC-Regionen isoliert wurden, waren identisch (Abb.11B). Dies zeigt, dass in den meisten Fällen während der B-Zell-Differenzierung keine Hypermutation stattgefunden hat. Jedoch besaßen beide Klonen, die aus den B/T-Zell-Infiltraten gewonnen wurden, Mitglieder mit unterschiedlichen Mutationsmustern (Abb.11B). Einer dieser Klonen unterschieden sich in mehr als 10 Mutationen (Abb.12A). Es konnten keine Sequenzen gefunden werden, die Zwischenglieder zwischen diesen stark diversifizierten Varianten des Klonen darstellten.

A

	13	19	30	CDR1				35	50	52a	53	54	56	59	67	72	73	81	82	89
DP-7	AAG	AAG	ACC	AGC	TAC	TAT	CAC	ATA	CCT	AGT	GGT	AGC	AGC	GTC	GAC	ACG	GAG	CTG	GTG	
B0029 InfI 3-8	---	---	TT-	---	---	G--	A--	--G	--A	--A	--A	---	-C-	---	---	---	---	T--	---	---
B0029 InfI 5-4	---	---	T-	---	---	G--	A--	--G	--A	--A	--A	---	-CG-	---	---	---	---	T--	---	---
B0029 InfII 2-1	G-	---	TT-	---	---	G--	A--	--G	--A	--A	--A	---	-C-	---	---	---	---	T--	---	---
B0029 AaII 4-5	---	---	TT-	---	---	G--	A--	--G	--A	--A	--A	---	-C-	---	---	---	---	T--	---	---
B0029 AaII 4-9	---	---	TT-	---	---	G--	A--	--G	--A	--A	--A	---	-C-	---	---	---	---	T--	---	---

B

	CDR1												CD2													
	13	19	20	22	30	32	34	52a	56	57	58	62	71	74	75	77	78	81	82a	82b	83	89	91			
DP-8	AAG	AAG	GTC	TGC	ACC	TAC	ATG	CCT	GGC	ACA	AAC	AAG	AGG	TCC	ATC	ACA	GCC	GAG	AGC	AGG	AGA	GTG	TAC			
B0029 VasI 2-3	---	-G-	---	---	-T-	C--	--A	---	---	---	---	-G-	---	--A	--T	---	-T-	-C-	---	--A	-C-	-AT	-A-	--A	--T	IgG4
B0029 VasI 2-4	---	-G-	---	---	-T-	C--	--A	---	---	---	---	-G-	---	--A	--T	---	-T-	-C-	---	--A	-C-	-AT	-A-	--A	--T	IgG1/2
B0029 VasI 2-6	---	-G-	---	---	-T-	C--	--A	---	---	---	---	-G-	---	--A	--T	---	-T-	-C-	---	--A	-C-	-AT	-A-	--A	--T	IgG1/2
B0029 VasI 3-5	---	-G-	---	---	-T-	C--	--A	---	---	---	---	-G-	---	--A	--T	---	-T-	-C-	---	--A	-C-	-AT	-A-	--A	--T	IgG1/2
B0029 VasII 5-1	---	-G-	---	---	-T-	C--	--A	---	---	---	---	-G-	---	--A	--T	---	-T-	-C-	---	--A	-C-	-AT	-A-	--A	--T	IgG1/2
B0029 VasII 5-4	---	-G-	---	---	-T-	C--	--A	---	---	---	---	-G-	---	--A	--T	---	-T-	-C-	---	--A	-C-	-AT	-A-	--A	--T	IgG1/2
B0029 VasII 5-3	-T-	-G-	---	---	-T-	C--	--A	---	---	---	---	-G-	---	--A	--T	---	-T-	-C-	---	--A	-C-	-AT	-A-	--A	--T	IgG1/2
B0029 VasV 4-12	---	---	---	---	-T-	C--	--A	---	---	---	---	-G-	---	--A	--T	---	-G-	-CT	---	-G-	---	---	---	---	--T	IgG4

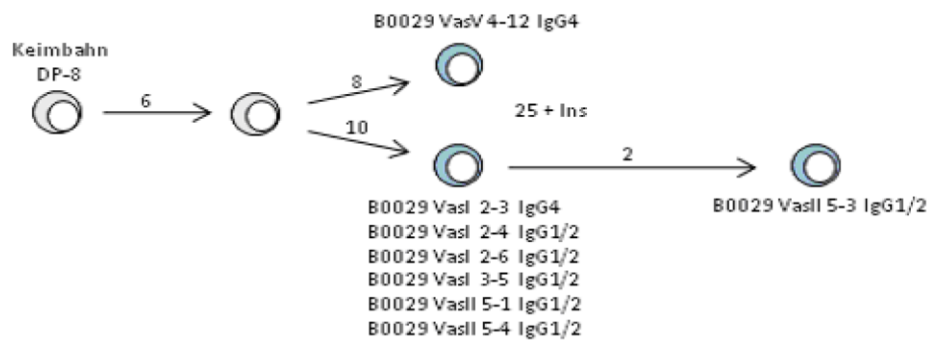


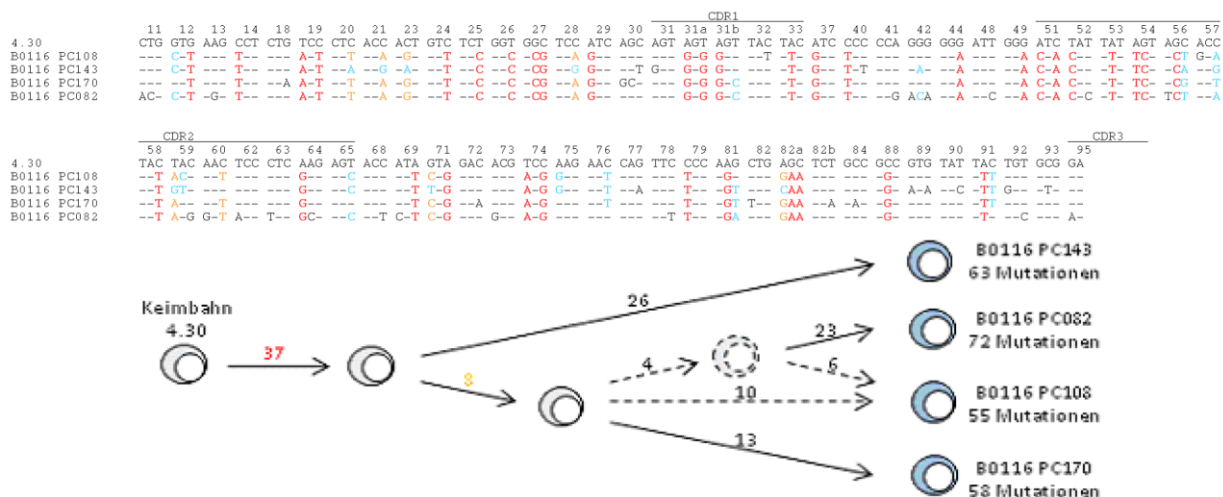
Abb. 12: Klonal verwandte Sequenzen aus Patient B0029.

A und B) Mutationsmuster von zwei Klonen mit fünf bzw. acht Zellen. In A handelte es sich um einen Klon, bei dem innerhalb eines B/T-Zell-Infiltrates eine stark mutierte Variante existierte. In B handelte es sich um einen Klon, der innerhalb der Vas-PC-Bereiche eine stark mutierte Variante besaß. Gezeigt sind ausschließlich Triplets in denen Mutationen aufgetreten sind. Nomenklatur und Position der CDR nach Vbase. Rot: Mutationen, in denen sich die Mitglieder der Klone unterscheiden. Mutationsbaum des Klones. Zahlen geben die Anzahl an Mutationen an.

Um auszuschließen, dass mögliche Zellen mit intermediären Mutationszahlen nicht entdeckt wurden, weil zu wenig Sequenzen analysiert worden waren, wurden zwei Klone aus Patient B0032 im Detail untersucht. Klon 1 wurde ursprünglich aus dem B/T-Zell-Infiltrat VIII isoliert. Beide Varianten des Klones besaßen 26 gemeinsame Mutationen. Variante 1A wies vier zusätzliche Mutationen auf und Variante 1B besaß vier unabhängige Basenaustausche (Abb.14A). Klon 2 stammte aus dem Infiltrat VI. Beide Varianten verfügten über zehn identische Mutationen. Während Variante 2A eine weitere Mutation besaß, trug Variante 2B drei zusätzliche stumme Mutationen (Abb.14B).

Um zu untersuchen, ob die beiden Klone in weiteren B/T-Zell-Infiltraten nachzuweisen sind, wurde die cDNA von fünf Infiltraten (InfVI bis InfX) verwendet und mit Klon-spezifischen Primern amplifiziert. Beide Klone konnten wiederholt nur aus den Infiltraten VIII bzw. VI gewonnen werden, aus denen sie ursprünglich isoliert wurden. Dies zeigt, dass die Klone innerhalb des SG expandierten, da ein unabhängiges Einwandern verschiedener Varianten eines Klones in nur ein Infiltrat sehr unwahrscheinlich ist.

A



B

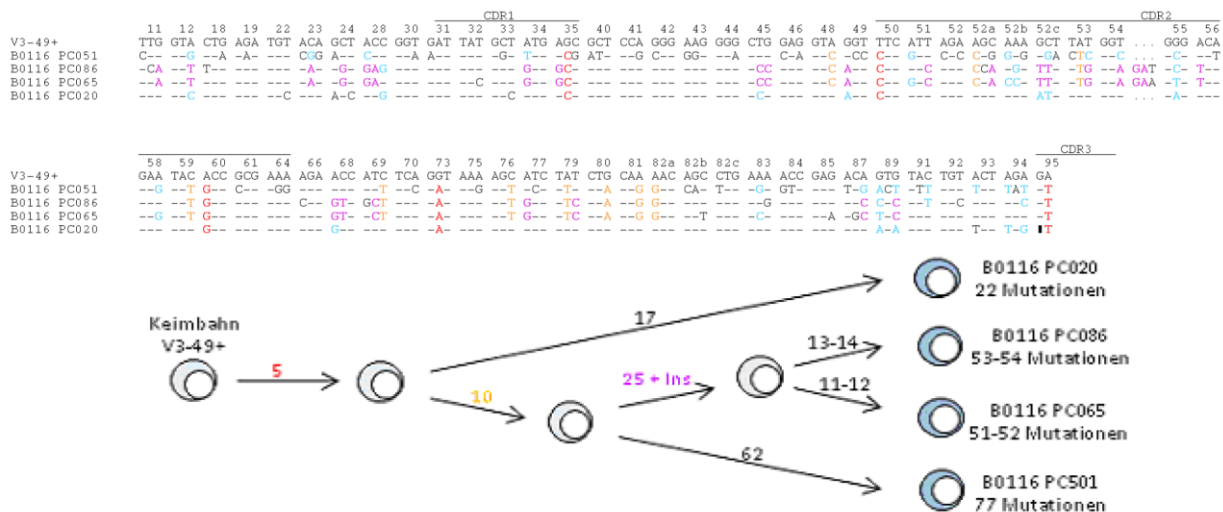


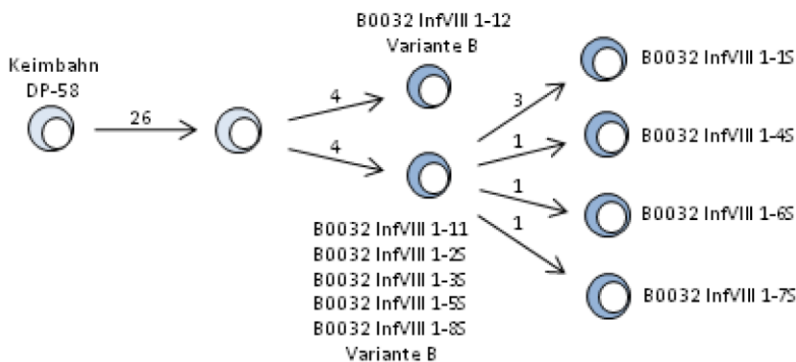
Abb. 13: Klonal verwandte Sequenzen aus Patient B0116.

A und B) Mutationsmuster und Mutationsbaum von zwei Klonen mit jeweils vier Zellen. Gezeigt sind ausschließlich Tripletts in denen Mutationen aufgetreten sind. Die Zählung der Tripletts und Position der CDR erfolgte nach Vbase. Rot: Mutationen, die alle vier Zellen gemeinsam haben. Orange und Violett: Mutationen, die nicht alle Zellen besitzen. Hellblau: Mutationen, die auf eine mögliche Selektion hindeuten. Die Zahlen in den Mutationsbäumen geben die Anzahl an Mutationen an.

Von jedem positiven PCR-Ansatz wurden acht Sequenzen analysiert. Von Klon 1 konnte nur Variante A wiedergefunden werden (Abb.14A). Allerdings besaßen vier Sequenzen eine bis drei zusätzliche Mutationen. Die zusätzlichen Mutationen lagen alle in unterschiedlichen Tripletts (Abb.14A). Auch von Klon 2 konnte nach der Reamplifikation nur Variante A nachgewiesen werden (Abb.14B). Allerdings konnten auch Sequenzen gefunden werden, die weniger Mutationen als Variante A aufwiesen (zum Beispiel B0032 InfVI 2-1S).

A Klon 1

		CDR1																CDR2																	
		13	18	23	24	28	29	30	31	34	41	48	50	52a	53	55	56	57	58	59	60	61	70	76	79	80	81	82a	85	90	93				
DF-58		CAG	CTG	GCA	GCC	ACC	TTC	AGT	AGT	ATG	CCA	GTT	TAC	AGT	AGT	AGT	ACC	ATA	TAC	TAC	GCA	ATC	AAG	G-T	TAT	CTG	CAA	AAC	GAG	TAT	GCG				
B0032	InfVIII 1-11	--A	---	---	---	--G	C--	--C	G--	G--	---	---	--T	--T	--C	G--	CGG	---	G--	--T	A--	--C	G--	G-T	--T	CT--	T--A	G--	---	G--	--C	--C	Variante A		
B0032	InfVIII 1-12	---	--A	---	A--	--G	---	G--	G--	---	---	---	--T	--T	--C	G--	CGG	---	G--	--T	A--	--C	G--	G-T	--T	CT--	T--A	G--	---	G--	--C	--C	Variante B		
B0032	InfVIII 1-15	--A	---	---	---	G--	C--	--C	G--	G--	---	---	--T	--T	--C	G--	CGA	---	GG--	--T	A--	--C	G--	G-T	--T	CT--	T--A	G--	--T	G--	--C	--C	} Variante A Reasmb.		
B0032	InfVIII 1-2S	--A	---	---	---	G--	C--	--C	G--	G--	---	---	--T	--T	--C	G--	CGG	---	G--	--T	A--	--C	G--	G-T	--T	CT--	T--A	G--	---	G--	--C	--C			
B0032	InfVIII 1-3S	--A	---	---	---	G--	C--	--C	G--	G--	---	---	--T	--T	--C	G--	CGG	---	G--	--T	A--	--C	G--	G-T	--T	CT--	T--A	G--	---	G--	--C	--C			
B0032	InfVIII 1-4S	--A	---	---	---	G--	C--	--C	G--	G--	C--	---	--T	--T	--C	G--	CGG	---	G--	--T	A--	--C	G--	G-T	--T	CT--	T--A	G--	---	G--	--C	--C			
B0032	InfVIII 1-5S	--A	---	---	---	G--	C--	--C	G--	G--	---	---	--T	--T	--C	G--	CGG	---	G--	--T	A--	--C	G--	G-T	--T	CT--	T--A	G--	---	G--	--C	--C			
B0032	InfVIII 1-6S	--A	---	---	A--	--G	C--	--C	G--	G--	---	---	--T	--T	--C	G--	CGG	---	G--	--T	A--	--C	G--	G-T	--T	CT--	T--A	G--	---	G--	--C	--C			
B0032	InfVIII 1-7S	--A	---	---	---	G--	C--	--C	G--	G--	---	---	--T	--T	--C	G--	CGG	--G	---	G--	--T	A--	--C	G--	G-T	--T	CT--	T--A	G--	---	G--	--C		--C	
B0032	InfVIII 1-8S	--A	---	---	---	G--	C--	--C	G--	G--	---	---	--T	--T	--C	G--	CGG	---	G--	--T	A--	--C	G--	G-T	--T	CT--	T--A	G--	---	G--	--C	--C			



B Klon 2

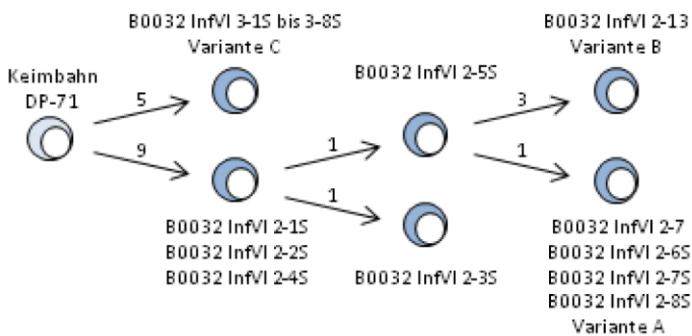
[illegible]

Abb. 14: Detaillierte Analyse von zwei B-Zell-Klonen aus Patient B0032.

A und C) Mutationsmuster von zwei Klonen, von denen stark diversifizierte Varianten gefunden wurden. Die Sequenzen, die ein S am Ende ihres Namens tragen, wurden durch eine spezifische PCR reamplifiziert. Gezeigt sind ausschließlich Triplets in denen Mutationen aufgetreten sind. Nomenklatur und Position der CDR nach Vbase. **B und D)** Mutationsbäume der Klone aus A und C. Zahlen geben die Anzahl an Mutationen an.

Zudem konnte in einem unabhängigen PCR-Ansatz eine neue Variante C isoliert werden. Diese Variante besaß ein vollkommen unterschiedliches Mutationsmuster. Demnach spaltete sich Variante C schon nach Aktivierung der naiven B-Zelle von den Varianten A und B ab.

Ig-Klassenwechsel in synovialen B-Zellen

Während der Analyse der repetitiven Sequenzen wurden sieben Beispiele gefunden, in denen dasselbe Rearrangement mit zwei verschiedenen schweren Ketten verknüpft war (Tab.4). Fünf dieser Klone stammten aus dem Patient B0029, zwei weitere aus dem Patienten B0032.

In vier Klonen erfolgte der Klassenwechsel von IgG1/2 zu IgG4 (Klon 1, 3, 4 und 5). Da IgG4 eine intrinsische RF-Aktivität besitzt, könnte das Auftreten von IgG4-Antikörpern zu einer chronischen Entzündung im SG beitragen [136,137,138,139]. Zusätzlich konnte ein Klon gefunden werden, in dem der Ig-Isotyp von IgM zu IgG1/2 gewechselt wurde (Klon 2). In zwei weiteren Fällen erfolgt die Rekombination von IgG1/2 zu IgA bzw. von IgG3 zu IgG1 oder IgG2 (Klon 6 bzw. 7). Die meisten Beispiele für klassengewechselte Klone stammten aus den Vas-PC. Auffallend war, dass alle Ig-Sequenzen, die aus B-Zellen innerhalb der B/T-Zell-Infiltrate gewonnen wurden (Klon 4 und 7), im Vergleich zu den klonal verwandten PC eine Klassenwechselrekombination durchgeführt hatten. Offensichtlich erfolgte der Klassenwechsel zumeist in Zellen, die zu Gedächtnis-B-Zellen differenzierten und in den B/T-Zell-Infiltraten verblieben, während die PC-Differenzierung ohne Klassenwechselrekombination ablief.

In den meisten Klonen war das Mutationsmuster vor und nach dem Klassenwechsel identisch. Es gab nur wenig zusätzliche Mutationen. Nur ein Klon trat in zwei Varianten auf (Klon 5, B0029 VasIII 5-3, sechs gemeinsame Mutationen mit den anderen Varianten des Klons) (Abb.12B). Dies unterstreicht, dass die Diversifizierung vor dem Klassenwechsel und vor der PC-Differenzierung stattfindet.

Tab. 4: Klassenwechsel im Synovialgewebe.

	Name	Isotyp	# Mutationen		Name	Isotyp	# Mutationen
1	B0029 AssI 9-4	IgG1/2	8		B0029 VasVI 5-7	IgG4	8+1
2	B0029 VasIII 3-3	IgM	2+1	→	B0029 VasIII 3-1	IgG1/2	2
	B0029 VasIII 3-4	IgM	2				
	B0029 VasIII 3-5	IgM	2				
3	B0029 VasII 3-4	IgG1/2	26	→	B0029 VasII 1-3	IgG4	26+2
					B0029 VasII 1-8	IgG4	26
4	B0029 VasIV 4-5	IgG1/2	12	→	B0029 VasIV 4-9	IgG4	12
					B0029 Infl 3-8	IgG4	12
					B0029 Infl 5-4	IgG4	12+10
					B0029 Infl 2-1	IgG4	12+1
5	B0029 VasI 2-4	IgG1/2	6+10	→	B0029 VasV 4-12	IgG4	6+8
	B0029 VasI 2-6	IgG1/2	6+10		B0029 VasI 2-3	IgG4	6+10
	B0029 VasI 3-5	IgG1/2	6+10				
	B0029 VasII 5-1	IgG1/2	6+10				
	B0029 VasII 5-4	IgG1/2	6+10				
	B0029 VasIII 5-3	IgG1/2	6+12				
6	B0039 AssIII 3-5	IgG1/2	40+Insertion	→	B0032 VasII 1-8	IgA	40+Insertion
	B0032 VasII 1-4	IgG1/2	40+Insertion				
7	B0032 AssI 7-1	IgG3	7	→	B0032 Infl 2-3	IgG1/2	7
	B0032 AssI 7-2	IgG3	7		B0032 Infl 2-6	IgG1/2	7
	B0032 AssI 7-5	IgG3	7+1		B0032 AssI 7-4	IgG1/2	7
	B0032 AssI 7-6	IgG3	7				
	B0032 AssI 7-7	IgG3	7+1				

Jede Sequenz wurde mit ihrem Namen, ihrem Ig-Isotyp und der Anzahl ihrer Mutationen angegeben. Die Sequenz B0029 VasIII 5-3 ist eine Variante des Klons, der sechs gemeinsame und 12 unterschiedliche Mutationen besaß. Inf: Sequenzen aus B/T-Zell-Infiltraten

A

		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	31a	31b	32	33	35	37	38	40	41	42	43	44	46	48	49
4.30		CTG	GTG	AAG	CCT	TGG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	ACT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	AGC	AGT	AGT	AGT	AGT	TAC	TAC	GGC	ATC	CGC	CCC	CCA	GGG	AAG	GGG	GAG	ATT	GGG
B0116	PC144	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B0116	PC109	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B0116	PC026	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B0116	PC061	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B0116	PC123	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B0116	PC152	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B0116	PC108	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B0116	PC143	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B0116	PC170	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B0116	PC082	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

B

		11	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
4.30		LVKPSSETLSLCTVSGGSISSSSYYWGIROPPGKGLEWIGSIYYSGSTYINPFLSKSRVTISVDTSKNQFPLKLSSTAAADTAVVYCAR										
B0116	PC144	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B0116	PC109	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B0116	PC026	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B0116	PC061	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B0116	PC123	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B0116	PC152	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B0116	PC108	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B0116	PC143	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B0116	PC170	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B0116	PC082	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

C

		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
YAC-7		VOGSAEVKFGKSSVVKSCASGGTSSYISWVROAPGOGLEWNGRIIIPILGIANVAKPOGRVTITADKSTSTAYMELSSRLSEDTAVVYCAR										
B0032	InfX 1-15	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B0116	PC0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

D

		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
DP70		OVOLQESGPGPLVKPSGTLTCAVSGGSISSSNWMSWVROPPGKGLEWIGSIYHSGSTYINPFLSKSRVTISVDTSKNQFPLKLSSTAAADTAVVYCAR											
B0032	InfX 1-15	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B0032	InfI 5-1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Abb. 15: Hinweise für Selektionsprozesse in synovialen PC.

A) Mutationsmuster von 12 Sequenzen aus Patient B0116. Jede Sequenz benutzte das V_H-Gen 4.30. Unter den 12 Sequenzen sind zwei Klone mit drei bzw. vier Sequenzen. Gezeigt sind ausschließlich Triplets in denen Mutationen aufgetreten sind. Nomenklatur und Position der CDR nach Vbase. Rot: Basenaustausche, die sich in mindestens zwei Rearrangements unabhängig ereignet haben. B-D) Austausch von Aminosäuren. B zeigt die 12 Sequenzen aus A. 81, 83 und 108: Position, an der in fast allen Rearrangements unterschiedliche Aminosäureaustausche stattgefunden haben. 71: Positionen, an denen es zum Austauschen mit sehr ähnlichen Aminosäuren kam. 79: Position, bei der in allen untersuchten Rearrangements zum gleichen Aminosäureaustausch kam. C und D zeigen zwei Beispiele von verschiedenen Rearrangements, deren CDR3-Region eine sehr hohe Ähnlichkeit aufwies. Nomenklatur und Position der CDR nach Vbase. Rot: gleiche Aminosäureaustausche bzw. gleiche Aminosäuren in der CDR3-Region.

Hinweise für eine Selektion von synovialen PC

In vielen PC, die das gleiche V_H -Gen benutzen, konnten ähnliche Mutationsmuster festgestellt werden (Abb.15). Diese Mutationen stellen jedoch keinen Beweis für eine Selektion dar, da während der SHM häufig die gleichen Nukleotidpositionen mutiert werden (Mutatorsequenzen).

Weitere Indizien für Selektion kann die CDR3-Region liefern. Auch hier wurden Beispiele von unterschiedlichen PC gefunden, die sehr ähnliche CDR3-Bereiche besaßen. So sind fünf der ersten sechs Aminosäuren der CDR3-Region der Sequenzen PC008 und PC062 aus Patient B0116 identisch (Abb.15C). Im V_H -Gen ließen sich zusätzlich ähnliche Mutationsmuster in der Aminosäuresequenz finden. Ein weiteres Beispiel für sich gleichende CDR-Regionen sind die Sequenzen Inf1 5-1 und InfX 1-15 aus Patient B0032 (Abb.15D). Beide PC exprimierten das V_H -Gen 4-04 und eine CDR3-Region mit gleicher Länge. Während in den V_H -Genen sehr unterschiedliche Aminosäureaustausche stattfanden, waren ihre CDR3-Regionen sehr ähnlich. Von den insgesamt 17 Aminosäuren der CDR3-Regionen waren 10 identisch.

Zusammengenommen zeigen diese Beispiele Hinweise dafür, dass synoviale PC für bestimmte Ag-Spezifitäten selektioniert wurden.

Analyse der Spezifität synovialer B-Lymphozyten

Das Auftreten klonal verwandter Zellen zwischen synovialen B-Zellen und PC deutet auf lokale Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen in den B/T-Zell-Infiltraten hin. Gleichzeitig sind aber nur sehr wenig proliferierende Zellen im SG zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die B-Zell-Antwort durch spezifische Ag im SG ausgelöst wird und dass nur sehr wenig synoviale B-Zellen spezifisch für solche Ag sind.

Um diese Spezifität synovialer B-Zellen und PC zu bestimmen, wurden die sortierten Sequenzen der Patienten B0114, B0116 und B0117 in Expressionsvektoren kloniert. Um rekombinante Antikörper zu gewinnen, wurde je ein Paar aus einer schweren und der dazugehörigen leichten Ig-Kette in HEK 293T-Zellen kotransfiziert. Insgesamt wurden 141 rekombinante Antikörper von synovialen naiven und Gedächtnis-B-Zellen sowie von PC generiert (Tab.5).

Tab. 5: Anzahl rekombinanter Antikörper.

IGHV-Familie	B0114	B0116	B0117	Summe
naive B-Zellen	17	-	12	29
Gedächtnis-B-Zellen	22	-	15	37
PC	33	18	24	75
	72	18	51	141

Angegeben ist die Anzahl gewonnener Antikörper aus naiven B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen und PC der Patienten B0114, B0116 und B0117.

Hohe Frequenz polyreaktiver naiver B-Zellen im SG von RA-Patienten

In gesunden Individuen werden die meisten polyreaktiven B-Zellen während des 1. Kontrollschrittes im Knochenmark aussortiert (Abb.4 und [10]). Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass der Anteil polyreaktiver B-Zellen im Blut von RA-Patienten stark erhöht war [84].

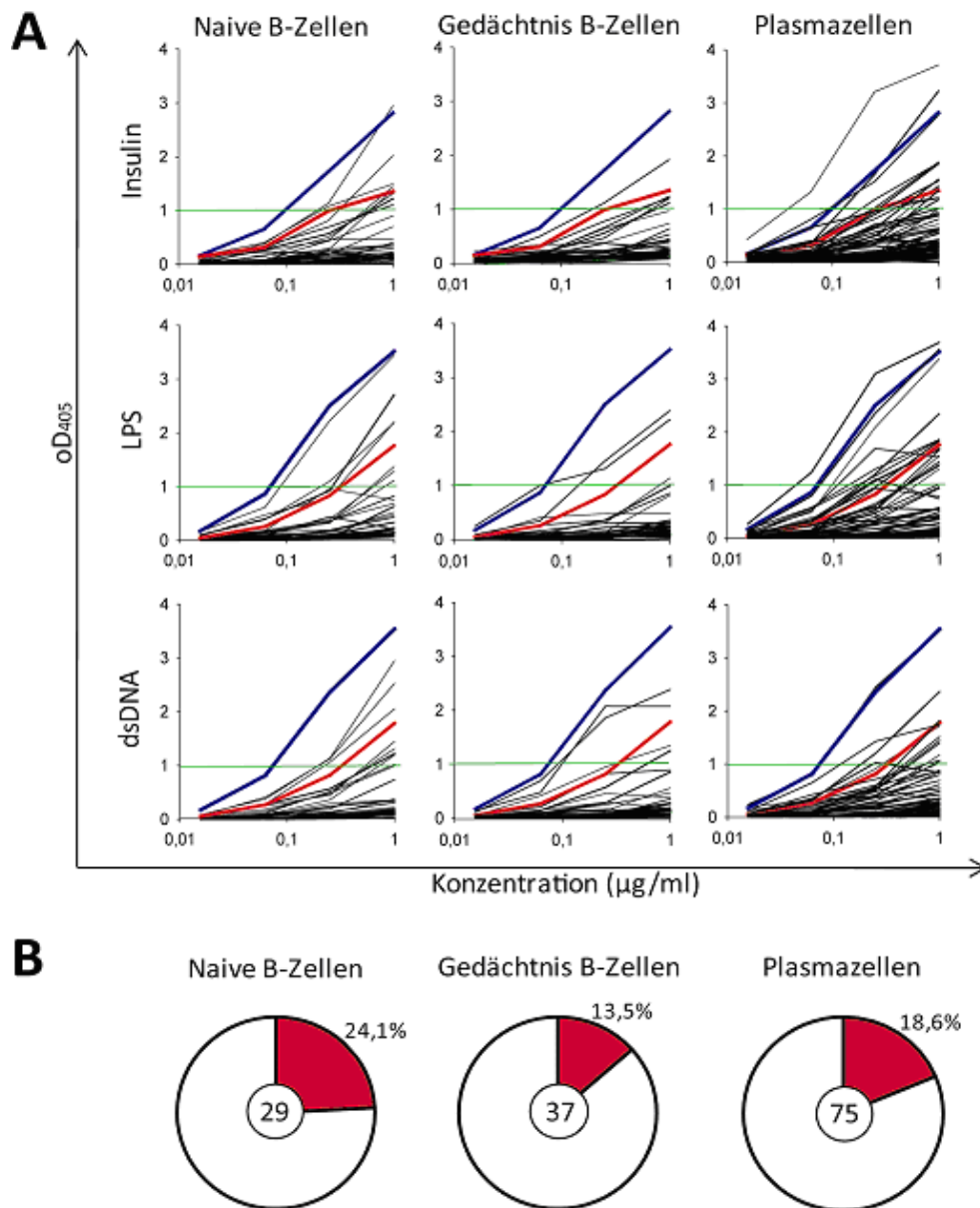


Abb. 16: Polyreaktivität von synovialen B-Lymphozyten.

A) Die rekombinanten Antikörper von naiven B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen und PC wurden für Bindung an Insulin, Lipopolysaccharid (LPS) und Doppelstrang-DNA (dsDNA) getestet. Als positiv wurden Antikörper gewertet, die in der höchsten Konzentration (1 µg/ml) eine oD von 1,0 überschritten (grüne Linie). Blaue Kurve: stark polyreaktive Kontrolle ED38 [140], rote Kurve: schwach polyreaktive Kontrolle JB40 [10]. **B)** Prozentualer Anteil an polyreaktiven Antikörpern aus naiven B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen und PC. Die Zahlen im Zentrum der Tortendiagramme geben die Anzahl der getesteten Antikörper an. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Populationen (χ^2).

Um den Anteil polyreaktiver Zellen im SG aus Patienten mit RA zu bestimmen, wurden die Antikörper in dem von Hedda Wardemann entwickelten Polyreaktivitätstest gemessen [10,82,83,84,140,141]. In diesem ELISA-Test wurde für jeden Antikörper die Kapazität bestimmt, die drei strukturell unterschiedlichen Ag-Klassen Proteine (Insulin), Zuckerketten (Lipopolysaccharid, LPS) und Nukleotide (Doppelstrang-DNA, dsDNA, negativ geladen) zu binden. Um die Reaktivität der Antikörper einzuschätzen, wurden zwei Kontrollantikörper mitgeführt. Dabei fungierte ED38 als ein stark polyreaktiver Antikörper [140] und JB40 als schwach polyreaktive

Kontrolle [10]. Antikörper die mindestens zwei der getesteten Ag mit einer vergleichbaren optischen Dichte (oD) wie JB40 erkannten, wurden als polyreaktiv definiert.

Den höchsten Anteil polyreaktiver Zellen besaßen naive B-Zellen (24,1%) (Abb.16). Der Anteil polyreaktiver Gedächtnis-B-Zellen und PC ist mit 13,5% bzw. 18,6% geringfügig niedriger, liegt jedoch in derselben Größenordnung.

Hoher Anteil autoreaktiver Gedächtnis-B-Zellen und PC im SG von RA-Patienten

Autoreaktivität an humanen Leberzellextrakten

Um den Anteil selbstreaktiver synovialer B-Lymphozyten zu bestimmen, wurde die Kapazität der Antikörper gemessen, humane Leberproteine zu binden. Es wurden Leberzellen ausgewählt, da sie eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine synthetisieren. Die Leberzellextrakte wurden mittels *Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese* aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Anschließend wurden die Antikörper einzeln auf der Membran inkubiert und mit einem Detektionsantikörper nachgewiesen (Abb.17A). Die erhaltenen Bandenmuster wurden densitometrisch quantifiziert und miteinander verglichen (Abb.17B). Um die Anzahl reaktiver Zellen zu bestimmen, wurden zwei Grenzwerte herangezogen. Zellen, die das Zellextrakt mit weniger als 500 Einheiten banden, galten als nicht reaktiv. Zellen, die eine Bindungskapazität zwischen 500 und 1500 Einheiten erreichten, galten als schwach und Zellen, welche die Leberzellextrakte mit mehr als 1500 Einheiten erkannten, als stark positiv.

Der Anteil reaktiver Antikörper war mit 3,4% in den naiven B-Zellen am geringsten (Abb.17C). In Gedächtnis-B-Zellen und PC lag der Anteil positiver Zellen bei ca. 25%. Ebenso lag der Anteil an nicht bindenden Zellen in der Population naiver B-Zellen mit ca. 75% höher als der von Gedächtnis-B-Zellen und PC (ca. 60%). Im Vergleich zu naiven B-Zellen war der Anteil Leberzellextrakt-erkennender PC signifikant höher (χ^2 : $p=0,03$).

Die Ergebnisse zeigen, dass der Anteil autoreaktiver Zellen in den Ag-erfahrenen B-Zell-Populationen höher ist als in naiven B-Zellen.

Autoreaktivität an HEp-2-Zellen

Die Bestimmung der Autoreaktivität mittels Leberzellextrakten erfolgte an denaturierten Proteinen. Um die Frequenz autoreaktiver Zellen zu bestimmen, die native zelluläre Proteine erkennen, wurden die rekombinanten Antikörper auf HEp2-Zellen getestet. Diese Fibroblastenzelllinie wird häufig in der Diagnostik für z.B. Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) und zur Charakterisierung von Autoantikörpern eingesetzt.

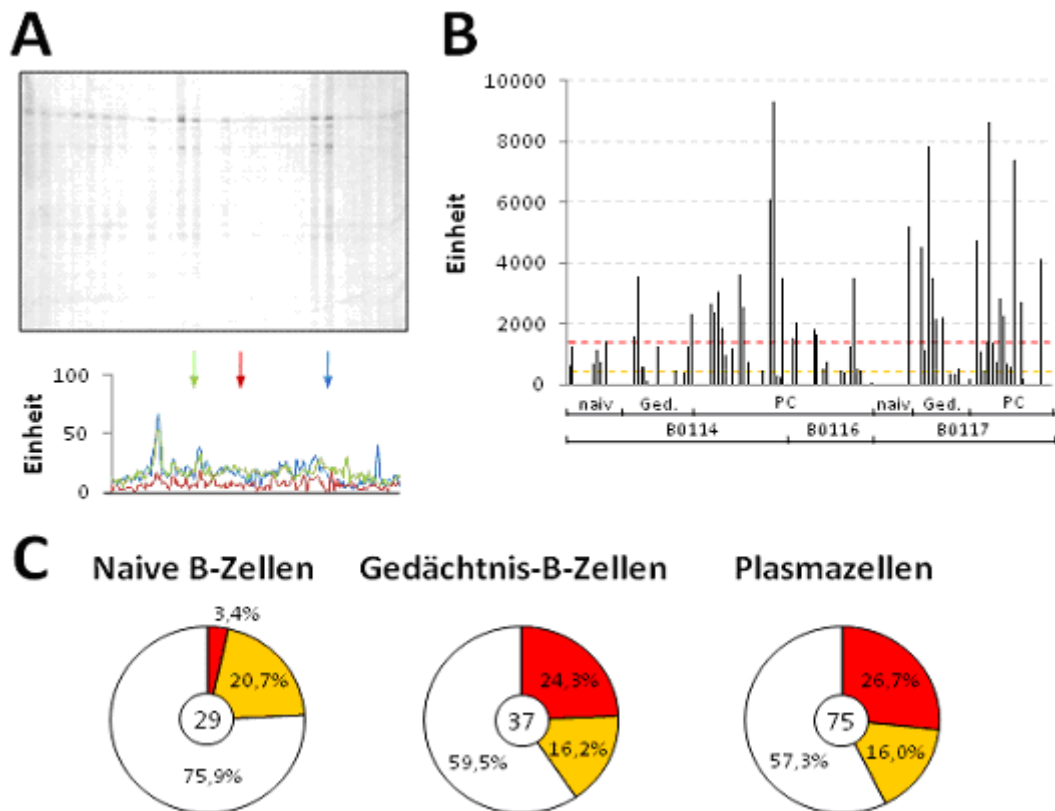


Abb. 17: Bindungs-kapazität der rekombinanten Antikörper an Leberzellextrakte.

A) Leberzellextrakte wurden aufgetrennt und mit rekombinanten Antikörpern inkubiert. Die Intensität der gebundenen Antikörper wurde densitometrisch gemessen. **B)** Relative densitometrische Stärke der Bindung der rekombinanten Antikörper an Leberzellextrakt. Die gestrichelte rote Linie definiert stark bindende Antikörper, die gestrichelte orange Linie schwach bindende Antikörper. **C)** Prozentualer Anteil an stark (rot) bzw. schwach (orange) bindenden Antikörper aus naiven B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen und PC. Die Zahlen im Zentrum der Tortendiagramme geben die Anzahl der getesteten Antikörper an. Naive B-Zellen waren signifikant unterschiedlich zu PC ($P=0,03$).

Die HEP-2-Zellen wurden mit den gewonnenen synovialen Antikörpern inkubiert und anschließend mit einem Detektionsantikörper nachgewiesen. Der Großteil der gewonnenen Antikörper färbte keine Strukturen der HEP-2-Zellen an. Lediglich 26 Antikörper erkannten verschiedene Muster in den HEP-2-Zellen. Erkannt wurden z.B. Elemente des Zytoskelettes, nukleäre Strukturen, der Spindelapparat (proliferierende Zellen) und Zytosolelemente (Abb.18A). Darüber hinaus gab es auch Antikörper, die keine eindeutigen Strukturen erkannten, sondern ein diffuses Einfärben der gesamten Zelle bewirkten. Der Anteil reaktiver Antikörper aus naiven B-Zellen lag bei 14%.

Von den Gedächtnis-B-Zellen färbten 16% und von den PC 21% der Antikörper Strukturen in den HEP-2-Zellen (Abb.18B). Somit ist der Anteil autoreaktiver Zellen in beiden Ag-erfahrenen B-Zell-Populationen höher als in der von naiven B-Zellen.

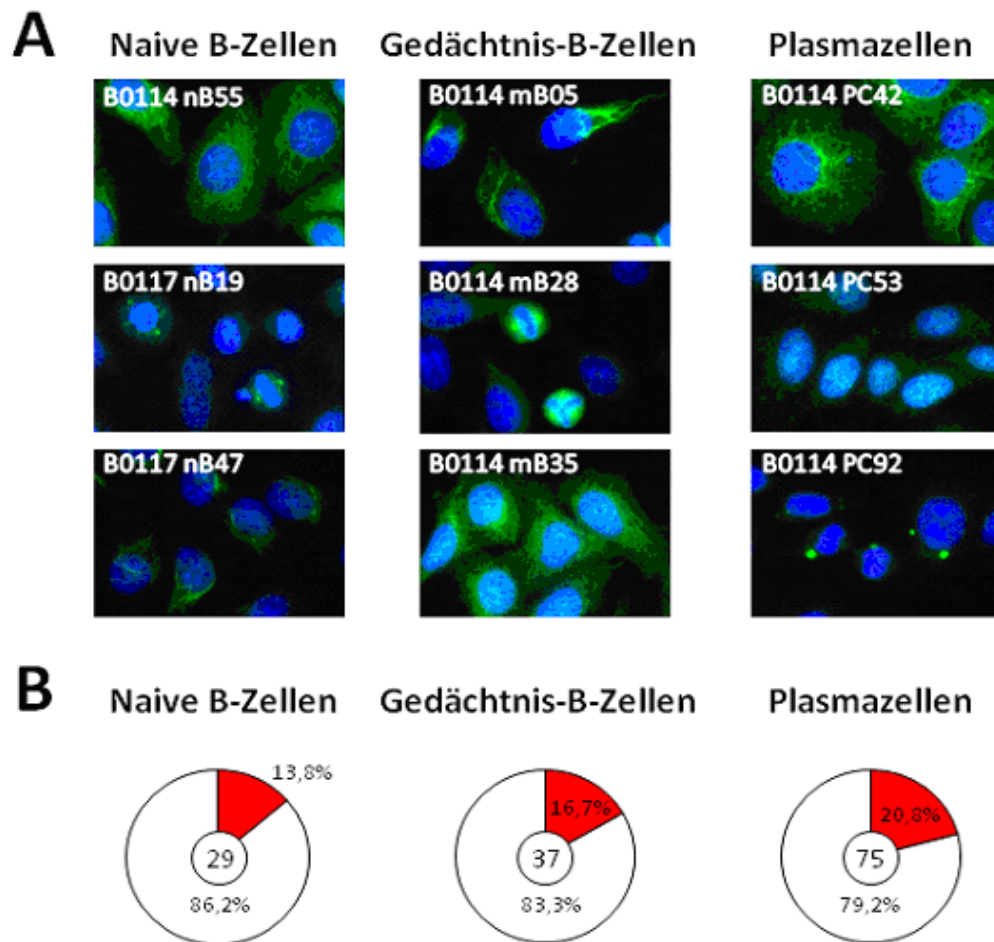


Abb. 18: Bindungs-kapazität der rekombinanten Antikörper an HEp2-Zellen.

A) Beispiele für typische autoreaktive Antikörper aus naiven B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen und PC. **B)** Prozentualer Anteil an autoreaktiven Antikörper aus naiven B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen und PC. Die Zahlen im Zentrum der Tortendiagramme geben die Anzahl der getesteten Antikörper an. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Populationen (χ^2).

Autoreaktivität im Synovialgewebe

Um zu ermitteln, ob die produzierten Antikörper Strukturen im SG erkennen, wurden aus den Antikörpern jedes Patienten und jeder Zellpopulation Gemische hergestellt und biotinyliert:

- Gemisch 1: Antikörper aus den naiven B-Zellen von Patient B0114 (17 Antikörper)
- Gemisch 2: Antikörper aus den Gedächtnis-B-Zellen von Patient B0114 (22 Antikörper)
- Gemisch 3: Antikörper aus den PC von Patient B0114 (33 Antikörper)
- Gemisch 4: Antikörper aus den PC von Patient B0116 (18 Antikörper)
- Gemisch 5: Antikörper aus den naiven B-Zellen von Patient B0117 (12 Antikörper)
- Gemisch 6: Antikörper aus den Gedächtnis-B-Zellen von Patient B0117 (15 Antikörper)
- Gemisch 7: Antikörper aus den PC von Patient B0117 (24 Antikörper)

Mit den biotinylierten Gemischen wurden Proben der SG der Patienten B0114, B0116 und B0117 sowie Gewebeproben einer Milz angefärbt (Tab.6).

Tab. 6: Bindeeigenschaften der rekombinanten Antikörper-Gemische an Synovialgewebe.

	Gem. 1	Gem. 2	Gem. 3	Gem. 4	Gem. 5	Gem. 6	Gem. 7
Milz	Zellen	Zellen	Zellen	-	-	-	-
SG B0114	PC	PC, Zellen	PC+	-	-	PC, Zellen	-
SG B0116	PC	PC	PC	PC, +	PC, Zellen	PC+	PC
SG B0117	PC	+	+	+	PC, +	PC	-

Gem.: Gemisch. Zellen: Antikörper-Gemische, die Zellen färbten, die keine B-Zellen oder PC sind. PC: Antikörper-Gemische, die PC färbten. +: Antikörper-Gemische, die Gewebsstrukturen färbten.

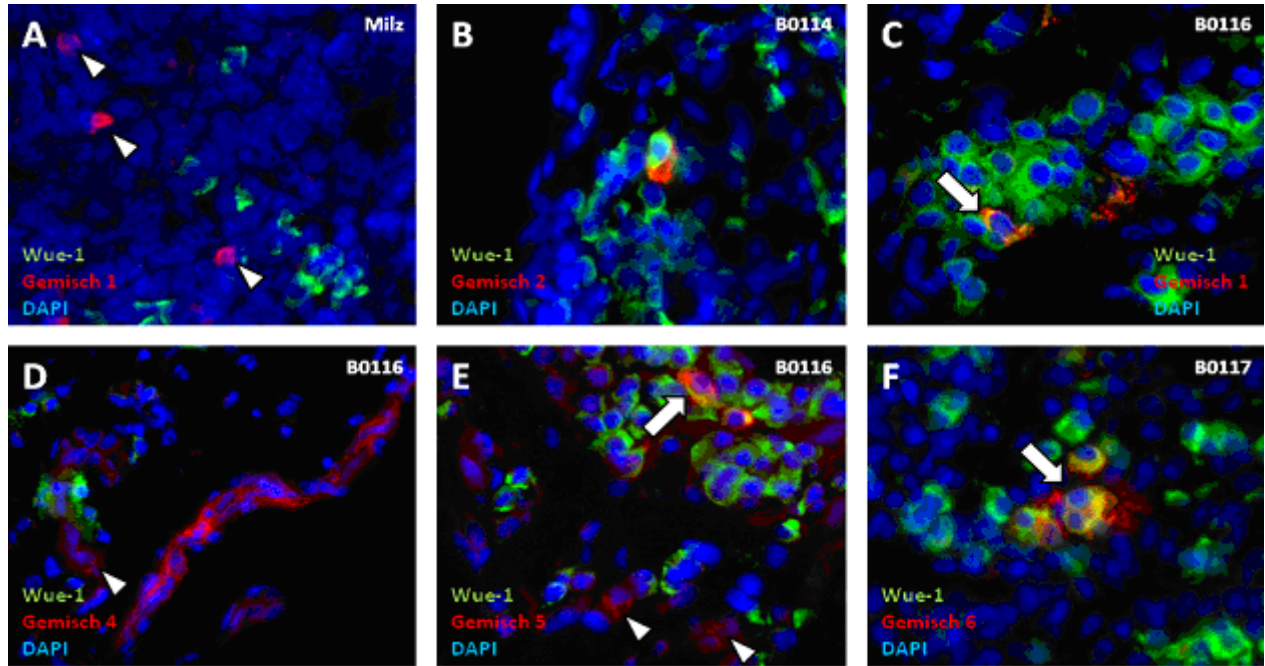


Abb. 19: SG-Färbungen mit Gemischen aus rekombinanten Antikörpern.

Auf jedem Schnitt wurden Plasmazellen (Wue-1) und Zellkerne (DAPI) gefärbt. Rot sind Strukturen angefärbt, die mit den Antikörper-Gemischen erkannt werden. **A)** Färbung des Gemisches 1 (naive B-Zellen von Patient B0114) auf Milzschnitten. **B)** Färbung des Gemisches 2 (Gedächtnis-B-Zellen von Patient B0114) auf SG des Patienten B0114. **C)** Färbung des Gemisches 1 (naive B-Zellen von Patient B0114) auf SG des Patienten B0116. **D)** Färbung des Gemisches 4 (PC von Patient B0116) auf SG des Patienten B0116. **E)** Färbung des Gemisches 5 (naive B-Zellen von Patient B0117) auf SG des Patienten B0116. **F)** Färbung des Gemisches 6 (Gedächtnis-B-Zellen von Patient B0117) auf SG des Patienten B0117; Vergrößerung: 400x, Pfeile: gefärbte PC. Pfeilspitzen: gefärbte Zellen, die keine PC sind.

Die drei Gemische des Patienten B0114 (Gemisch 1, Gemisch 2 und Gemisch 3) erkannten Zellen in der Milz, die gleichmäßig in der roten Pulpa verteilt waren. Dabei handelte es sich nicht um B-Zellen (anti-CD20-negativ) oder PC (Wue-1-negativ) (Abb.19A). In den SG-Schnitten der drei Patienten konnten Strukturen detektiert werden, die oftmals eng mit PC assoziiert waren (Abb.19B). Zusätzlich wurden auch vereinzelt PC erkannt (Abb.19C). Das Anfärben der PC ließ sich mit unmarkierten IgG-Antikörpern blocken. Da alle rekombinanten Antikörper eine schwere Kette des IgG1-Isotyps besitzen, wurden die Antikörper der Gemische wahrscheinlich passiv von RF-exprimierenden PC im SG gebunden. Im Milzgewebe konnten keine PC angefärbt werden. Dies unterstreicht das Vorhandensein von RF-exprimierenden PC im SG. In allen drei Patienten konnten RF-positive PC detektiert werden. Die Frequenz lag dabei bei ca. 1/200 bis 1/400 PC.

Im Gegensatz dazu erkannten die Antikörper des Gemisches 4 keine Strukturen auf den Milzschnitten. Allerdings kam es bei Gemisch 4 zu einer generellen Färbung des eigenen SG (Patient B0116). Darüber hinaus wurden im Besonderen die Endothelzellen der Gefäße gefärbt (Abb.19D). Die Gemische des Patienten B0117

(Gemisch 5 bis 7) zeigten ein sehr heterogenes Färbemuster. In der Milz konnten keine Strukturen angefärbt werden. Einige der Gemische erkannten Gewebsstrukturen oder PC im SG (Tab.6). Das Gemisch 5 erkannte neben PC auch andere Zellen im SG (Abb.19E). Mit Gemisch 6 konnte nicht nur ein Teil der PC, sondern auch sezernierte Antikörper um die PC detektiert werden (Abb.19F).

Die hier gewonnenen Daten zeigen, dass die rekombinanten synovialen Antikörper körpereigene Strukturen erkennen können. Sowohl an Leberzellextrakten (Abb.17), an HEp-2-Zellen (Abb.18) als auch im SG (Abb.19) konnten positive Antikörperreaktionen gefunden werden. Der Anteil naiver autoreaktiver B-Zellen war jeweils geringer als der Anteil autoreaktiver Gedächtnis-B-Zellen und PC.

Häufiges Auftreten bakterienspezifischer Zellen im SG von RA-Patienten

Bis heute ist nicht geklärt, was die auslösenden Faktoren für RA sind. Neben genetischen Faktoren werden Umwelteinflüsse und verschleppte oder fehlregulierte Infektionen, die sich in Gelenken festsetzen können, diskutiert. Dabei werden besonders Parodontitis-auslösende Bakterien als Kandidaten beschrieben, deren DNA man im SG nachweisen konnte [142,143,144]. Um zu untersuchen, ob es im SG Zellen mit Spezifität gegen Parodontitis-auslösende Bakterien gibt, wurde die Bindungskapazität der synovialen Antikörper in einem ELISA-Test gegen fünf verschiedene Bakterienstämme ermittelt. Getestet wurden die gram-negativen Stämme *Porphyromonas gingivalis* (P.g.), *Prevotella intermedia* (P.i.), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.) und *Fusobacterium nucleatum* (F.n.) und der gram-positive Stamm *Streptococcus mutans* (S.m.). Um festzustellen, ob Zellen mit Spezifität gegen Parodontitis-auslösende Bakterien im SG dominieren, wurde zudem die Reaktivität gegen vier kommensale Bakterienstämme bestimmt. Unter den getesteten Bakterien befanden sich die gram-negativen Stämme *Enterobacter cloacae* (E.c.), *Escherichia coli* (E.coli) und *Morganella morganii* (M.m.) und der gram-positive Stamm *Enterococcus faecalis* (E.f.).

Ein Antikörper galt als positiv, wenn er im ELISA eine optische Dichte bei 405nm (oD405) von mehr als 0,5 bewirkte. Da die meisten Antikörper unter einer oD von 1,0 blieben, entspricht die oD-Grenze von 0,5 etwa der Hälfte der oD-Schwankungsbreite aller Antikörper und Ag.

Für den Parodontitis-Keim P.g. konnten zwei reaktive Antikörper gefunden werden (Abb.20). Allerdings banden beide Antikörper noch weitere Bakterien und wurden deshalb als polyreaktiv eingestuft. Bei den beiden Antikörpern, die S.m. erkannten, handelte es sich um die gleichen Antikörper, die auch P.g. banden. Für P.i. wurden vier reaktive Antikörper gefunden, wobei nur einer spezifisch für P.i. war (B0114 mB28, Abb.20). A.a. wurde von 14 Antikörpern gebunden, wobei nur einer von ihnen die Kriterien für Monospezifität erfüllte (B0114 nB02). Das Bakterium F.n. wurde von 31 Antikörpern erkannt, wobei 15 von ihnen monoreaktiv waren (Abb.20).

Insgesamt wurden 17 synoviale Antikörper identifiziert, die Parodontitis-auslösende Bakterien monospezifisch erkannten (12%). Interessant war der Befund, dass alle diese Antikörper aus den Patienten B0114 und B0116 stammten.

Im Gegensatz dazu erkannten die rekombinanten Antikörper kommensale Bakterienstämme mit einer viel geringeren Frequenz (Abb.20). Für E.coli wurde gar kein reaktiver Antikörper gefunden. Die Stämme E.c. und

E.f. wurden nur von einem bzw. zwei Antikörpern erkannt, wobei alle drei Antikörper zusätzlich noch Parodontitis-auslösende Bakterien erkannten. Lediglich für M.m. konnte ein monospezifischer Antikörper gefunden werden (B0117 mB28, Abb.20). Somit war die Anzahl von Antikörpern, die kommensale Bakterienstämme erkannten 15 bis 20-fach niedriger als die von Antikörpern gegen Parodontitis-auslösende Keime.

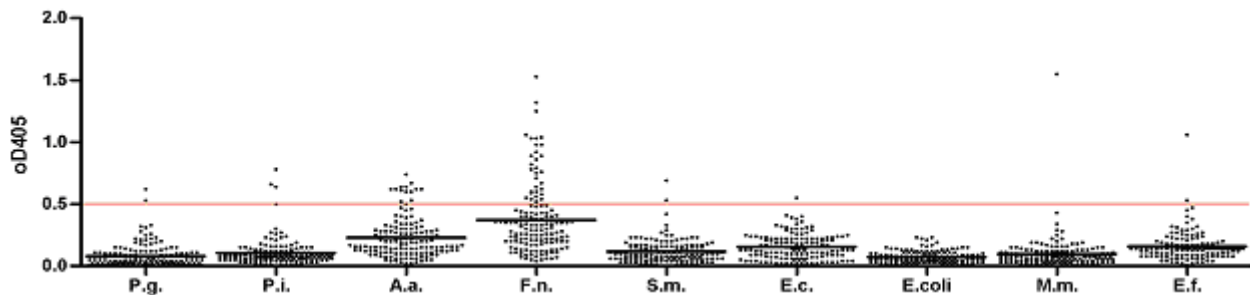


Abb. 20: Spezifitätsbestimmung an bakteriellen Antigenen.

Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert von zwei unabhängigen Versuchen. Antikörper, die eine höhere optische Dichte bei 405nm (oD405) als 0,5 erreichten (rote Linie) wurden als positiv angesehen. Der schwarze Balken zeigt den Durchschnitt aller Antikörper an. P.g.: *Porphyromonas gingivalis*; P.i.: *Prevotella intermedia*; A.a.: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; F.n.: *Fusobacterium nucleatum*; S.m.: *Streptococcus mutans*; E.c.: *Enterobacter cloacae*; E.coli: *Escherichia coli*; M.m.: *Morganella morganii*; E.f.: *Enterococcus faecalis*

Alle monospezifische Antikörper gegen Bakterien waren mutiert und die Mehrzahl exprimierte eine klassengewechselte schwere Ig-Kette.

Die hier gewonnenen Daten zeigen, dass im SG Gedächtnis-B-Zellen und PC vorhanden sind, die bakterielle Ag erkennen. Dabei sind Zellen, die gegen Parodontitis-auslösende Keime gerichtet sind, 15 bis 20-mal häufiger anzutreffen als Zellen, die mit kommensalen Bakterien reagieren. Dies unterstützt die These, dass Parodontitis-auslösende Bakterienstämme zur Pathogenese der RA beitragen können.

Synoviale PC erkennen RA-assoziierte Autoantigene

Um die Anzahl von Zellen zu ermitteln, die RA-assoziierte Auto-AG erkennen, wurden die rekombinanten Antikörper auf Bindung an RF, Kollagen Typ II, MCV (mutiertes citrulliniertes Vimentin) und unmodifiziertes Vimentin untersucht.

Für die drei Auto-AG RF, Kollagen und Vimentin erreichte kein Antikörper eine oD von mehr als 0,4 (Abb.21). Im Gegensatz dazu wurde ein Antikörper gefunden, der spezifisch für MCV war (B0117 PC07, oD 0,8). Dieser Antikörper war absolut negativ für die Bindung an alle weiteren getesteten Ag und stellte deshalb einen guten Kandidaten für einen humanen Autoantikörper dar. Der MCV-spezifische Antikörper besaß eine mutierte und klassengewechselte Ig-Kette und stammte von einer PC ab. Der Prozentsatz von Zellen mit Spezifität gegen RA-assoziierte Auto-AG lag bei unter einem Prozent. Dies ist deutlich weniger als der Anteil bakterienspezifischer Zellen.

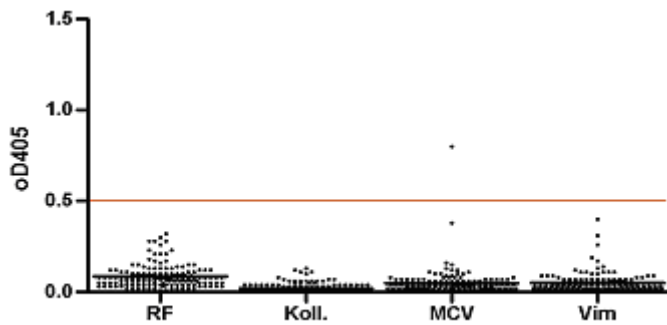


Abb. 21: Spezifitätsmessung an RA-assoziierten Auto-AG.

Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert von zwei unabhängigen Versuchen. Antikörper, die eine höhere optische Dichte (oD) als 0,5 erreichten (rote Linie) wurden als positiv angesehen. Der schwarze Balken zeigt den Durchschnitt aller Antikörper an. RF: Rheumafaktor, Koll.: Kollagen Typ II, MCV: mutiertes citrulliniertes Vimentin, Vim: Vimentin

Sezernierung von hoch affinen Autoantikörpern im SG

Um die Spezifität des MCV-spezifischen Antikörpers zu ermitteln, wurde die kinetische Charakteristik des Antikörpers mittels der *Biacore Surface Plasmon Resonanz-Technologie* ermittelt. Als Kontrolle wurde der Antikörper B0114 nB02, der für die meisten Ag sehr niedrige oD-Werte erreichte, gewählt. Jedoch besaß dieser Antikörper eine der stärksten Bindungen an RF. Als weitere Kontrolle wurde der polyklonale Antikörper B0114 PC72 genutzt, der Insulin mit einer oD von 3,22 band. Alle drei Antikörper spiegeln somit die gesamte Bandbreite der Antikörperreaktivität für drei verschiedene Ag wider.

Für die Messung wurden die drei Antikörper an Biacore-Reaktionschips immobilisiert. Anschließend wurde die Stärke der Wechselwirkung zu den vier Ag MCV, Vimentin, IVIg (IgG- Antikörper) und Insulin gemessen. Der Antikörper B0117 PC07 besaß eine starke Bindung zu MCV, nicht jedoch zu der uncitrullinierten Variante von Vimentin, zu IVIg und zu Insulin (Abb.22A). Dies bestätigte die ELISA- Daten, dass der Antikörper monospezifisch zu MCV war. Im Gegensatz dazu band der Antikörper B0114 nB02 keines der vier Ag. Auch der Antikörper B0114 PC72 blieb negativ für alle vier Ag. Dieses Ergebnis war unerwartet, da der Antikörper im ELISA-Test Insulin mit einer sehr hohen oD erkannte.

Um die kinetischen Parameter des MCV-spezifischen Antikörpers zu ermitteln, wurde die Wechselwirkung zwischen Antikörper und MCV unter verschiedenen MCV-Konzentrationen gemessen. Dabei wurde der Versuch mit zwei unterschiedlichen Bedingungen wiederholt. Im Versuch A wurde eine Assoziationszeit von fünf Minuten und eine Durchflussrate von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ gewählt (Abb.22B). Versuch B wurde unter stringenteren Bedingungen durchgeführt. Hierbei wurde MCV für acht Minuten bei einer Durchflussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ assoziiert (Abb.22C). In beiden Versuchen wurden ähnliche Werte für die Assoziationskonstante (K_a), die Dissoziationskonstante (K_d) und die daraus resultierende Affinität des Antikörpers ermittelt (Tab.7). Die Ermittlung erfolgte unter Einbeziehung verschiedener Modelle. Sämtliche Modelle bestimmten dabei eine Affinität im Bereich zwischen 10^{-8} und 10^{-9} M. Das Modell mit den geringsten Abweichungen zu den Messwerten war das Modell mit einer driftenden Grundlinie. Die Assoziationskonstante war mit ca. 10^4 1/Ms relativ gering. Dafür bildete sich ein Komplex, der auch nach längerer Dissoziationszeit sehr stabil blieb (Abb.22B und C).

Die hier gewonnenen Daten zeigen, dass im SG Autoantikörper mit sehr hoher Affinität vorhanden sind.

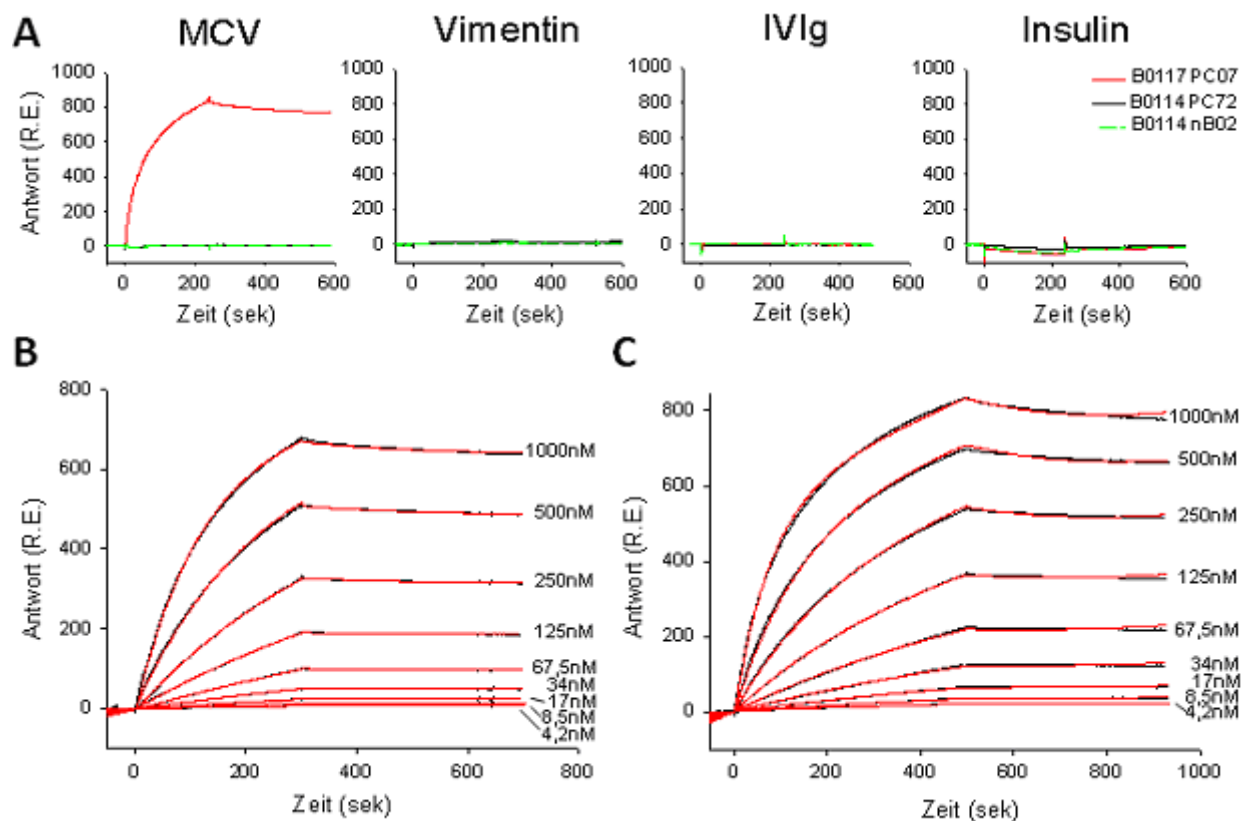


Abb. 22: Affinitätsmessung mittels Biacore.

A) Messung der Bindungskapazität der drei Antikörper B0117 PC07, B0114 PC72 und B0114 nB02 an MCV, Vimentin, IVIg und Insulin. **B und C)** Detaillierte Analyse der Bindungskapazität des Antikörpers B0117 PC07 an MCV mit zwei verschiedenen Bedingungen. Es wurden neun unterschiedliche Verdünnungen für MCV gemessen. In B wurde eine Assoziationszeit von 5min und eine Durchflussrate von 10 μ l/min benutzt. In C wurde eine Assoziationszeit von 8min und eine Durchflussrate von 30 μ l/min eingestellt. Die schwarzen Kurven geben die gewonnenen Messwerte wieder. Die roten Kurven repräsentieren die Rekursion der Messwerte.

Tab. 7: Berechnung der kinetischen Konstanten der Wechselwirkung des Antikörpers B0117 PC07 und MCV.

	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	Affinität (M)	χ^2
Langmuir Bindung / Versuch A	$8,49 \times 10^3$	$8,75 \times 10^{-5}$	$1,03 \times 10^{-8}$	2,1
Langmuir Bindung / Versuch B	$1,34 \times 10^4$	$7,27 \times 10^{-5}$	$5,44 \times 10^{-9}$	6,09
Bindung mit driftender Grundlinie / A	$8,19 \times 10^3$	$7,2 \times 10^{-4}$	$8,8 \times 10^{-8}$	0,369
Bindung mit driftender Grundlinie / B	$1,3 \times 10^4$	$5,1 \times 10^{-4}$	$3,93 \times 10^{-8}$	0,573
Bindung mit Massentransfer / A	9×10^3	$9,09 \times 10^{-5}$	$1,01 \times 10^{-8}$	2,05
Bindung mit Massentransfer / B	$1,34 \times 10^4$	$7,25 \times 10^{-5}$	$5,43 \times 10^{-9}$	6,09

Die Berechnung erfolgte mit drei unterschiedlichen Modellen (Langmuir-Bindung, Bindung mit driftender Grundlinie und Bindung mit Massentransfer). Die Assoziationskonstante (K_a), die Dissoziationskonstante (K_d) und die Affinität wurden von beiden Versuchen ermittelt.

Diskussion

Ungerichtete Amplifikation humaner Ig-Gene.

Um die synoviale B-Zell-Antwort zu untersuchen, wurde eine detaillierte Analyse von Ig aus naiven und Gedächtnis-B-Zellen sowie aus PC durchgeführt. Die Sequenzen wurden dabei mittels zweier unterschiedlicher Methoden (Mikrodissektion und Durchflusszytometrie) gewonnen. Die Mikrodissektion erlaubt die Isolation von Zellen mit genau definierter Lokalisation. Allerdings ist die Gewinnung von einzelnen Zellen schwierig, zeitaufwendig und teuer. Aus diesem Grund wurden Gruppen von bis zu 10 Einzel-PC bzw. kleine Bereiche, bestehend aus 10 bis 20 B-Zellen mikrodissektiert. Aus den Zellgemischen wurden in der Regel zwischen 3 und 5 Ig-Sequenzen gewonnen, was darauf hindeutet, dass die PCR-Strategie nicht dazu geeignet ist, die Ig-Sequenzen aller in der Probe enthaltenen Zellen zu amplifizieren. Es kommt vielmehr zu einer statistischen Selektion einzelner Sequenzen. Trotz dessen erfolgt die Amplifikation der Ig-Gene ungerichtet, denn das Repertoire von B-Zellen entspricht exakt dem Standard-Repertoire naiver B-Zellen aus dem Blut gesunder Individuen. Desweiteren konnte im Prinzip jedes funktionelle V_H -Gen amplifiziert werden, was zeigt, dass die verwendeten Primer für die Ig-Amplifikation der V_H -Gene das gesamte Spektrum der funktionellen V_H -Gene abdecken.

Im Vergleich zur Mikrodissektion war die Durchflusszytometrie die geeignetere Methode, um effizient Einzelzellen aus dem SG zu isolieren. Im Gegensatz dazu erlaubt die Durchflusszytometrie die Gewinnung von Einzelzellen. Bei der anschließenden Amplifikation der Ig kam es ebenfalls zu keiner statistischen Selektion einzelner Sequenzen. Die Ausbeute an brauchbaren Ig-Sequenzen lag je nach Population bei 30-70%. Der Nachteil dieser Methode ist, dass Informationen über die Lage der Zellen verloren gehen. Deshalb ist es nicht möglich zwischen Ass-PC und Vas-PC zu unterscheiden, da beide PC-Populationen nur anhand ihrer histologischen Lokalisation, nicht jedoch über Oberflächenmarker, definiert wurden.

In der Analyse der durchflusszytometrisch sortierten naiven B-Zellen exprimierten nur 56% der Zellen einen unmutierten BCR mit einer IgM-schweren Kette. Die restlichen Zellen waren entweder hypermutiert, besaßen eine klassengewechselte schwere Kette oder beides. Sie wurden daher den Gedächtnis-Zellen zugeordnet. Offensichtlich konnte während der Zellsortierung nicht eindeutig zwischen naiven und Gedächtnis-B-Zellen unterschieden werden. Dies könnte daran liegen, dass einige aktivierte naive B-Zellen noch keine erhöhte CD27-Expression zeigten, obwohl sie bereits SHM und Klassenwechsel durchgeführt hatten. Dennoch wurden sämtliche Sequenzen, die aus der $CD27^{neg}$, $CD38^{neg}$ -Population naiver B-Zellen gewonnen wurden, zusammen analysiert.

Lokale Aktivierung von B-Zellen im SG

Die Sequenzanalyse der mikrodisezierten und durchflusszytometrisch sortierten B-Zellen und PC zeigte, dass im SG B-Zell-Aktivierung stattfindet. Diese Schlussfolgerung wird gestützt durch

- die geringe Anzahl proliferierender Zellen in B/T-Zell-Infiltraten,
- ein verändertes V_H -Gen-Repertoire in synovialen Gedächtnis-B-Zellen und PC,
- ein individuelles V_H -Gen-Repertoire synovialer PC verschiedener RA-Patienten (Abb.23),
- klonal verwandte Sequenzen in synovialen B-Zell- und PC-Populationen,
- verschiedene Ig-Isotypen in ansonsten identischen Ig-Sequenzen,
- Anzeichen für eine Ag-Selektion im Mutationsmuster und der CDR3-Region synovialer PC und
- einem gleich hohen Anteil polyreaktiver PC wie in gesunden Individuen.

Selektioniertes Ig-Repertoire in synovialen Gedächtnis-B-Zellen und PC

Die mit beiden Methoden gewonnenen Daten zeigen, dass sowohl naive B-Zellen als auch Gedächtnis-B-Zellen in das SG einwandern können. Dabei liegt der Anteil naiver B-Zellen bei maximal 25%. Da die Frequenz naiver B-Zellen im Blut von RA-Patienten mit ca. 64% (22% Gedächtnis-B-Zellen und 5% PC, Daten nicht gezeigt) um einiges höher ist, kommt es im SG zu einer präferenziellen Anhäufung von Gedächtnis-B-Zellen.

Der Großteil der B-Lymphozyten organisiert sich dabei in B/T-Zell-Infiltraten, in denen sich unter passenden Bedingungen ektopische Keimzentren bilden können [130,145]. Ektopische Keimzentren sind allerdings nur in einer Minderheit der RA-Patienten nachweisbar [122,123,124,125]. In Infiltraten ohne Keimzentren sind nur wenig proliferierende B-Zellen anzutreffen. Auch eine detaillierte histologische Charakterisierung der untersuchten SG an konsekutiven Schnitten konnte keine Zone proliferierender B-Zellen detektieren. Offenbar wird nur ein Bruchteil der immigrierten B-Zellen aktiviert und differenziert zu synovialen PC.

Das V_H -Gen-Repertoire von naiven B-Zellen entspricht dem Standard-Repertoire von naiven B-Zellen aus dem Blut gesunder Individuen. Im Repertoire der Gedächtnis-B-Zellen kam es zu signifikanten Unterschieden gegenüber dem Standard-Repertoire naiver B-Zellen. In der Population synovialer PC konnten ebenfalls Unterschiede festgestellt werden. Dies könnte das Resultat einer Ag-spezifischen B-Zell-Antwort sein, die dazu führt, dass nur bestimmte B-Zellen mit bestimmten V_H -Genen zu PC differenzieren. Die Verschiebungen im V_H -Gen-Repertoire waren in den Vas-PC ausgeprägter als in den Ass-PC. In den durchflusszytometrisch sortierten PC konnten allerdings keine Unterschiede zum V_H -Gen-Repertoire naiver B-Zellen aus dem Blut gesunder Probanden festgestellt werden. Offensichtlich entsprachen die gemittelten V_H -Gen-Repertoires der Patienten B0112 bis B0117 in etwa dem Standard-Repertoire, obwohl die einzelnen Patienten unterschiedliche Selektionsmuster aufwiesen (Abb.23). So besaßen vier Patienten eine Überrepräsentation von V_H1 -Sequenzen. Im Gegensatz dazu besaß Patient B0112 gar keine Zellen der V_H1 -Familie. Dafür waren in diesem Patienten Zellen, die Antikörper der V_H3 - und V_H5 -Familie exprimierten, überrepräsentiert. Die V_H4 -Familie war in zwei Patienten unterrepräsentiert (B0002 und B0029) und in Patient B0117 überrepräsentiert. Dies könnte zum Beispiel durch individuelle Immunantworten gegen verschiedene (Auto-)Ag im SG oder in der Peripherie erklärt

werden. Jedoch erreichten nur die Verschiebungen im V_H-Gen-Repertoire des Patienten B0029 statistische Signifikanz.

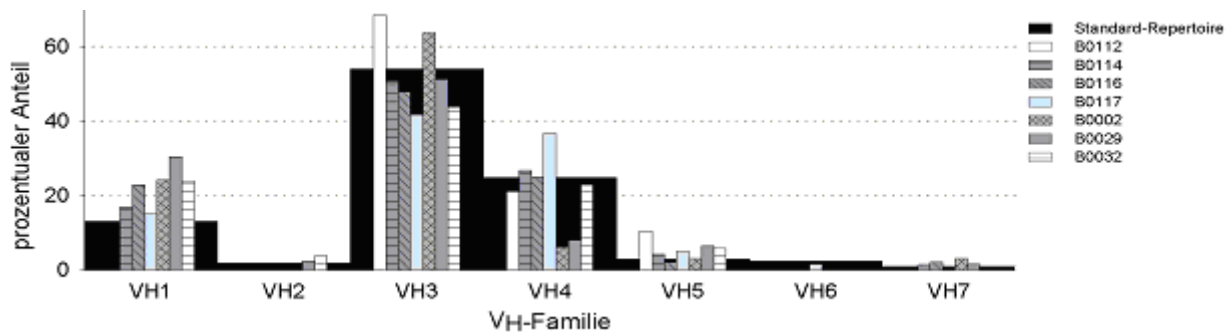


Abb. 23: V_H-Gen-Repertoire synovialer PC aller untersuchter Patienten.

Bei den Patienten B0002, B0029 und B0032 wurden Ass-PC und Vas-PC zusammengefasst. Das Standard-Repertoire wurde von [134] entnommen. Das Repertoire der PC von Patient B0029 unterschied sich signifikant vom Standard-Repertoire ($p < 0,001$).

In gesunden Individuen exprimieren ca. 40-50% der B-Zellen eine λ -leichte Kette [5]. In den hier analysierten Sequenzen wurden nur 8,7% λ -exprimierende Zellen identifiziert. Da die leichte Kette maßgeblich an der Spezifität der B-Zelle beteiligt ist, könnte diese Abweichung eine Folge von Selektion bestimmter B-Zell-Klone sein.

Im D- und J_H-Gen-Repertoire kam es nur zu geringen Verschiebungen in den drei Populationen. Auch die Länge der CDR3-Region und die Eigenschaften der enthaltenen Aminosäuren zeigten keine Unterschiede untereinander. Einzig die Vas-PC-Population des Patienten B0029 besaß eine längere CDR3-Region als alle anderen Populationen. Zusätzlich zeigten Vas-PC eine stärkere Veränderung im V_H-Gen-Repertoire als Ass-PC. Die Zahl an somatischen Mutationen in den PC variierte von durchschnittlich 10 bis 30 Mutationen pro V_H-Gen. Die meisten Patienten akkumulierten 17 bis 20 Mutationen im V_H-Gen. Dabei lag die Mutationsfrequenz in Vas-PC etwas höher als in Ass-PC (nicht signifikant). Zusammen mit dem Befund, dass die Veränderungen im V_H-Gen-Repertoire und die Länge der CDR3-Region in den Vas-PC ausgeprägter waren als die in den Ass-PC, zeigt dies, dass beide PC-Populationen zum Teil unterschiedliche Zellen beinhalten.

Veränderungen im V_H-Gen-Repertoire synovialer B-Zellen wurden bereits beschrieben. In einer Studie, die IgG-exprimierende Zellen (Gedächtnis-B-Zellen und PC) analysierte, wurde eine Dominanz von Sequenzen der V_H1-Familie gezeigt [131]. In der Mehrzahl der hier untersuchten Patienten kam es ebenfalls zu einer deutlichen Überexpression an PC der V_H1-Familie (Abb.23). In anderen Arbeiten, wurde das Repertoire der κ -leichten Kette [126], von IgG-RF [146], von IgM-RF [147] und von B-Zellen im Blut und SG von Patienten mit RA untersucht [148]. In all diesen Studien wurde ein verändertes V_H-Gen-Repertoire und eine lokale Aktivierung und Selektion von B-Zellen im SG beschrieben.

Anhäufung klonal verwandter Zellen im SG

In den 192 unterschiedlichen V_H-Rearrangements, die aus synovialen Einzel-PC gewonnen werden konnten (Patient B0112, B0114, B0116 und B0117), wurden 7 Klone gefunden (entspricht einer Frequenz von 1 aus 27;

3,6%). Drei der Klone wurden sogar in vier Zellen identifiziert. Da die leichten Ig-Ketten dieser Zellen ebenfalls klonal verwandt waren, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei diesen Beispielen wirklich um Klone und nicht um PCR-Verunreinigungen handelt. Sowohl in den naiven B-Zellen, als auch in den Gedächtnis-B-Zellen wurden keine Klone identifiziert. In der Population der naiven B-Zellen, wurden naturgemäß keine Klone erwartet. In Gedächtnis-B-Zellen ist die Frequenz von klonal verwandten Zellen möglicherweise zu gering, um sie in nur 70 Einzelzellen zu detektieren.

Das Auftreten von PC-Klonen war stark abhängig vom Patienten. In zwei Patienten konnten keine Klone gefunden werden, während in Patient B0116 sechs Klone in 42 analysierten Rearrangements identifiziert wurden (14,3%). Da Patient B0116 keine synovialen B-Zellen besaß, könnten die PC langlebige Überbleibsel aus früheren synovialen B-Zell-Aktivierungen sein. Eine alternative Erklärung könnte eine unabhängige Einwanderung der PC aus dem Blut sein. Allerdings wurden für die Sortierung der Einzelzellen mehrere SG-Stückchen aus dem gleichen Gelenk enzymatisch verdaut. Die Klone stammen daher wahrscheinlich nicht aus einem eng begrenzten Bereich. Dass trotzdem sechs Klone in nur 42 analysierten Rearrangements gefunden werden konnten, weist auf eine Expansion dieser Klone im SG hin und nicht auf ein unabhängiges Einwandern.

Klonal verwandte Ig-Sequenzen ließen sich besonders häufig in B/T-Zell-Infiltraten und ihren korrespondierenden Ass-PC-Bereichen, sowie innerhalb verschiedener Regionen aus Vas-PC nachweisen. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass synoviale B-Zellen lokal im SG aktiviert wurden und zu PC differenzierten, da bei einem Einwandern der B-Zell-Klone eine gleichmäßige Verteilung der verwandten Zellen im gesamten SG zu erwarten ist und nicht eine Anhäufung in bestimmten SG-Bereichen. Wie bereits beschrieben, waren das V_H-Gen-Repertoire, die CDR3-Länge und die Anzahl an somatischen Mutationen in Vas-PC leicht unterschiedlich zu Ass-PC. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich die Zusammensetzung der beiden PC-Populationen unterscheidet. Allerdings konnten Zellen mit gleichen Rearrangements in beiden Populationen nachgewiesen werden, was für einen Austausch von PC zwischen beiden PC-Regionen spricht. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Repertoires in beiden Populationen könnte sein, dass zusätzlich PC, die außerhalb des SG generiert wurden, ins SG einwandern und dort Antikörper sezernieren.

In einer früheren Studie konnten keine klonal verwandten Zellen aus Infiltraten und PC-Bereichen identifiziert werden [124]. Allerdings wurden in dieser Studie weniger Ig-Sequenzen als in der vorliegenden Arbeit analysiert. Desweiteren wurde die Studie in SG mit ektopischen Keimzentren durchgeführt. In diesen Geweben kommt es zu einer ausgeprägten B-Zell-Proliferation. Möglicherweise stammten die Sequenzen aus den ektopischen Keimzentren von gerade aktivierten B-Zellen, während sich die darum liegenden Ass-PC größtenteils aus älteren Zellen zusammensetzten.

Ig-Klassenwechsel im SG

Insgesamt wurden sieben Klone mit unterschiedlichen Isotypen identifiziert. Die Mehrzahl von ihnen besaß eine mutierte V_H-Sequenz und stammt daher von Gedächtnis-B-Zellen bzw. PC. In fünf Fällen kam es zu einem Klassenwechsel weg von der hauptsächlich auftretenden Ig-Klasse IgG1/2. Da die meisten Gedächtnis-B-Zellen einen BCR vom IgG1 oder IgG2 Isotyp exprimieren, ist dieser Befund nicht überraschend. In vier der fünf

Beispiele exprimierten die PC daraufhin den seltenen IgG4-Isotyp. Von Antikörpern des IgG4-Isotyps ist bekannt, dass sie eine intrinsische RF-Aktivität besitzen [136,137,138]. Desweiteren wurde für IgG4-Antikörper beschrieben, dass sie halbe Moleküle mit anderen IgG4-Antikörpern austauschen und somit bispezifische Antikörper generieren können [149]. Beide IgG4-Eigenschaften könnten zur Bildung von Immunkomplexen führen und somit die chronische Entzündungsreaktion im SG verstärken.

Auffallend war, dass die meisten Beispiele klassengewechselter Zellen ausschließlich aus der PC-Population stammten. Entweder waren die korrespondierenden B-Zellen nicht mehr im SG vorhanden oder ihre Frequenz zu gering. Wenn klassengewechselte Klone sowohl in PC als auch in B-Zellen auftraten, exprimierten die PC oftmals die originale schwere Kette, während die korrespondierenden Gedächtnis-B-Zellen in den B/T-Zell-Infiltraten CSR durchgeführt hatten. Offensichtlich erfolgt die Differenzierung zur PC meist ohne Klassenwechsel, während parallel dazu entstehende Gedächtnis-B-Zellen ihren Isotyp wechseln können.

Anzeichen für eine selektionierte synoviale PC-Population

Einige der analysierten Sequenzen zeigten Hinweise für Selektion für bestimmte Ag. So besaßen Sequenzen der gleichen V_H -Familie oftmals Mutationen an der gleichen Position im V_H -Gen. Einige dieser Mutationen führten zu gleichen Aminosäureaustauschen. Dies könnte dann der Fall gewesen sein, wenn die Affinität zu bestimmten Ag mit der neuen Aminosäure zunahm. Andere Positionen waren ebenfalls oft mutiert, jedoch führte die Mutation zu unterschiedlichen Aminosäuren. Hierbei könnte sich die ursprüngliche Aminosäure nachteilig auf die Affinität ausgewirkt haben. Allerdings stellen diese Mutationen keinen Beweis für Selektion dar, da während der SHM häufig dieselben Positionen mutiert werden, weil sie in so genannten Mutatorsequenzen sitzen. Desweiteren können einzelne V_H -Gene alle Varianten besitzen, die Nukleotid-Polymorphismen an bestimmten Positionen bereits im Genom kodiert haben.

Da die CDR3-Region zwischen zwei unterschiedlichen B-Zellen in der Regel stark verschieden ist, besitzt sie kaum Mutatorsequenzen an den gleichen Positionen. Zusätzlich ist die Länge der CDR3-Region sehr variabel. Aus diesem Grund liefert sie stärkere Hinweise auf Selektion als die V_H -Gen-Sequenz. In den CDR3-Bereichen der analysierten Ig-Sequenzen konnten Beispiele mit bemerkenswerter Ähnlichkeit gefunden werden. In einigen Beispielen waren mehr als 50 % der Aminosäuren der CDR3-Region von zwei völlig verschiedenen Rearrangements identisch. Offensichtlich werden im SG B-Zellen mit bestimmten Sequenzeigenschaften selektiv aktiviert. Dies führt zum einen zu einem veränderten V_H -Gen-Repertoire und zum anderen zum Auftreten von charakteristischen Mutationsmustern in den Ig-Sequenzen.

Bevorzugte Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen

Die Mehrzahl der klonal verwandten Sequenzen war völlig identisch. Dies spricht gegen eine ausgeprägte somatische Hypermutation während der PC-Differenzierung in SG ohne ektopische Keimzentren. Dies wird dadurch unterstützt, dass die durchschnittliche Mutationszahl pro V_H -Gen in den Gedächtnis-B-Zellen und den PC in der gleichen Größenordnung lag. Allerdings wurden in einigen Klonen des Patienten B0032 Hinweise für

Diversifizierung gefunden. Der Großteil der Sequenzen, die in mehr als zwei Mutationen variierten, konnte durch Sequenzfusionen erklärt werden. Dabei fungiert eine verkürzte Sequenz in den darauffolgenden PCR-Zyklen als Primer. Sequenzfusionen sind daran zu erkennen, dass sich ansonsten identische Sequenzen ab einer bestimmten Position zum Teil drastisch unterscheiden.

In einer detaillierten Suche nach klonal verwandten Ig-Sequenzen wurden expandierte Klone, nur in einem individuellen Infiltrat nachgewiesen. Es gab keine Anzeichen für ein Auftreten der Klone in weiteren Infiltraten. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei einem unabhängigen Einwandern klonal verwandter Zellen, diese nur in einem Infiltrat nachzuweisen sind, ist sehr gering. Deshalb spricht dieser Befund dafür, dass die verschiedenen Varianten während der synovialen B-Zell-Antwort im SG generiert wurden.

Die Tatsache, dass in beiden reamplifizierten Klonen (Klon 1 und Klon 2 aus Patient B0032) nur eine von zwei Varianten reamplifiziert werden konnte, weist auf mögliche PCR-Artefakte oder eine selektive Amplifikation der Sequenzen hin. Dennoch konnten Varianten desselben Rearrangements mit unterschiedlichem Mutationsmuster gefunden werden. Der seltene Nachweis von unterschiedlichen Varianten könnte auch dadurch zustande kommen, dass von mehreren gebildeten Varianten nur eine zu langlebigen Gedächtnis-B-Zellen oder PC ausdifferenziert und die anderen verlorengehen. Dabei würde man trotz SHM nur sehr wenig verschiedene Sequenzen außerhalb der B/T-Zell-Infiltrate finden.

In Keimzentren von sekundären lymphatischen Organen ist der Hypermutationsprozess stark an die Proliferation der B-Zellen gekoppelt [150]. Im Unterschied zu den ausgeprägten Proliferationszonen in herkömmlichen Keimzentren, wurden in den B/T-Zell-Infiltraten nur vereinzelte proliferierende Zellen identifiziert. Offensichtlich durchlaufen B-Zellen nach Aktivierung im SG keine ausgedehnte Proliferationsphase, sondern differenzieren sogleich zu PC. Dies würde erklären, dass es nur in einem geringen Ausmaß zur somatischen Hypermutation kommt. Möglicherweise sind im SG außerhalb ektopischer Keimzentren die Bedingungen für eine klassische Proliferationsphase nicht gegeben. Alternativ könnte auch adäquate T-Zell-Hilfe fehlen. T-Zell-unabhängige SHM wurde bisher nur in unreifen B-Zellen beschrieben [151,152,153,154]. Dessen ungeachtet könnten diese Mechanismen bei günstigen Bedingungen auch in anderen Entwicklungsstadien der B-Zellen zum Tragen kommen.

Die Mehrzahl der synovialen PC besaß hochmutierte Ig-Gene. Da keine Anzeichen für einen ausgeprägten Hypermutationsprozess gefunden werden konnten, spricht dies dafür, dass im SG hauptsächlich Gedächtnis-B-Zellen aktiviert werden. Dies könnte ein weiterer Grund für das Fehlen einer ausgeprägten Proliferation und Hypermutation sein.

Hoher Anteil polyreaktiver naiver B-Zellen

Die Ermittlung polyreaktiver Antikörper erfolgte analog zu bereits veröffentlichten Studien [10,82,83,84,140,141]. Der Anteil polyreaktiver Zellen lag mit 24% bei den naiven B-Zellen am höchsten. Eine ähnliche Studie, die an peripheren naiven B-Zellen aus RA-Patienten durchgeführt wurde, zeigte, dass die Frequenz polyreaktiver naiver B-Zellen bis zu 30 % betragen kann [84]. Somit liegt der hier bestimmte Wert für naive B-Zellen im Einklang mit älteren Ergebnissen. Dies zeigt, dass die naiven B-Zellpopulationen aus dem Blut

und dem SG von RA-Patienten einen stark erhöhten Anteil polyreaktiver B-Zellen besitzen. Offensichtlich gibt es in RA-Patienten ein fehlerhaftes Aussieben polyreaktiver B-Zellen während der B-Zellentwicklung. Das Ergebnis zeigt auch, dass naive B-Zellen unselektioniert in das SG einwandern können.

In gesunden Individuen steigt der Anteil an polyreaktiven Zellen in der IgG-Gedächtnis-B-Zell-Population deutlich an [82]. Im Gegensatz dazu war die Frequenz polyreaktiver Gedächtnis-B-Zellen im SG niedriger als in naiven B-Zellen. Offensichtlich rekrutieren sich synoviale Gedächtnis-B-Zellen nicht vorwiegend aus polyreaktiven naiven Zellen. Um dies zeigen zu können, könnte man die Ig-Sequenzen der Gedächtnis-B-Zellen in die unmutierte Keimbahnkonfiguration zurückführen und dann analysieren, ob die Antikörper immer noch polyreaktiv sind. Mit solch einem Ansatz konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl autoreaktive IgG-Gedächtnis-B-Zellen, als auch Ro52- und La-spezifische Gedächtnis-B-Zellen aus Patienten mit Systemischen Lupus Erythematoses (SLE), mit ihrem Keimbahn-Ig nicht mehr autoreaktiv waren [82,83]. Die niedrige Frequenz polyreaktiver Gedächtnis-B-Zellen im SG könnte damit zusammenhängen, dass sich im SG Zellen mit bestimmten Spezifitäten ansammeln. Möglicherweise akkumulieren autoreaktive B-Zellen durch wiederholte Aktivierung im SG, während Zellen, die nicht für synoviale Ag spezifisch sind, sterben oder wieder aus dem SG auswandern. In diesem Modell wäre die Mehrzahl der Zellen, die synoviale Ag erkennen, nicht polyreaktiv.

Die Frequenz polyreaktiver PC aus dem SG war ebenfalls geringer als die naiver B-Zellen und liegt im oberen Bereich der beobachteten Frequenzen polyreaktiver PC aus gesunden Probanden (6 - 18%, Kofer J und Wardemann H, unveröffentlichte Daten). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die synoviale B-Zell-Antwort Ag-spezifisch ist und nicht mehrheitlich von polyreaktiven B-Zellen durchgeführt wird.

Expression hoch affiner Autoantikörper im SG

Der Anteil autoreaktiver Antikörper wurde mittels Leberzellextrakten, HEp-2 Zellen, SG-Färbungen und ELISA gegen RA-Auto-AG bestimmt. Der Test am Leberextrakt wurde durchgeführt, um Antikörper zu finden, die humane zelluläre Proteine binden. Hier zeigten sich eine Reihe von Antikörpern, die zum Teil sehr stark mit den Leberproteinen wechselwirkten. Unerwarteterweise war das Bandenmuster aller positiven Antikörper gleich. Offenbar banden die Antikörper Strukturen mit ähnlichen Eigenschaften auf mehreren Proteinen. Es konnte kein Antikörper identifiziert werden, der eine individuelle Bande erkannte. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass es sich bei den Leberextrakten um denaturierte Proteine handelte. Dies könnte dazu führen, dass normalerweise verdeckte Epitope, wie z.B. stark hydrophobe Bereiche, für die Antikörper erreichbar werden. Da es eine Vielzahl von Proteinen mit hydrophoben Bereichen gibt, würde dies auch erklären, warum die Antikörper polyreaktiv erscheinen. Allerdings konnten unter den Leberextrakt-bindenden Antikörpern keine besonderen CDR3-Eigenschaften wie z.B. der Anzahl an neutralen oder geladenen Aminosäuren gefunden werden.

Ein Teil der rekombinanten Antikörper erkannte zelluläre Strukturen in HEp-2-Zellen. Der Prozentsatz positiver Antikörper war geringer als der in den Leberextrakten. In den meisten Fällen wurden intrazelluläre Proteine erkannt. Es gab allerdings auch diffuse Färbemuster, die entweder von polyreaktiven oder von membranbindenden Antikörpern stammen könnten. In stark entzündlichen Bereichen, wie im SG, könnten

intrazelluläre Proteine durch verstärkte Nekrose für B-Zellen bzw. Antikörper zugänglich werden. Stark repetitive Proteine, wie Zytoskelettelemente könnten sogar zu einer T-Zell-unabhängigen Aktivierung von B-Zellen führen [5].

Um zu überprüfen, ob unter den gewonnenen Antikörpern solche mit Spezifität für synoviale Ag existieren, wurden Gemische von Antikörpern zusammengestellt und biotinyliert. Interessanterweise erkannten sämtliche Gemische aus Patient B0114 Zellen im Milzgewebe gesunder Individuen. Somit exprimierten sowohl naive B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen als auch PC Ig mit der gleichen Spezifität. Allerdings bestand das Gemisch der naiven B-Zellen aus vier Antikörpern, die eine mutierte und klassengewechselte Ig-Kette besaßen. Ob die zelluläre Färbung durch einen Antikörper ausgelöst wurde, der aus diesen vier Zellen generiert wurde, konnte nicht ermittelt werden. Deshalb ist es potentiell möglich, dass nur Gedächtnis-B-Zellen und PC dieses zelluläre Muster färbten. In den SG wurde vorwiegend ein Teil der PC gefärbt. Nur vereinzelt wurden andere Zelltypen gebunden. Das Gemisch mit Antikörpern aus PC des Patienten B0116 färbte hauptsächlich Strukturen im eigenen SG an. Dabei wurden besonders Endothelzellen erkannt. Da das gleiche Gemisch in den Geweben der Patienten B0114 und B0117 keine Endothelzellen anfärbte, besaß es damit mindestens einen Autoantikörper, der Gefäße nur im eigenen SG erkannte. Gleichzeitig bedeutet dieser Befund, dass die Gefäße des Patienten B0116 anders beschaffen waren, als in allen anderen getesteten Geweben. Die Gründe dafür können vielfältig sein. Zum einen kann der Aktivierungsstatus der Endothelzellen unterschiedlich sein, was einen Einfluss auf die Expression von Proteinen wie Zelladhäsionsmolekülen oder Adressinen haben könnte. Auf der anderen Seite könnten Pathogene wie Bakterien oder Viren an den Gefäßwänden kleben, die durch die Antikörper erkannt werden.

Ein ebenso überraschender Befund war die Tatsache, dass in fast allen getesteten SG PC angefärbt werden konnten. Bei diesen PC könnte es sich um RF-sezernierende Zellen handeln, welche rekombinanten IgG-Antikörper banden. Auf diese Weise konnte eine ungefähre Frequenz an RF-exprimierenden PC bestimmt werden. Sie liegt je nach Patient bei etwa 1/200 bis 1/400 Zellen. Da in allen drei SG positive PC detektiert wurden, besaß mit hoher Wahrscheinlichkeit jeder Patient PC mit RF-Spezifität. Die klinischen Daten des Patienten B0032 bestätigten diesen Befund (Tab.16). Von den anderen Patienten wurde bisher kein RF-Titer gemessen.

Um die Frequenz autoreaktiver Antikörper zu bestimmen, die RA-assoziierte Auto-Ag erkennen, wurden ELISA-Messungen durchgeführt. Dabei konnten keine RF-, Vimentin und Kollagen-spezifischen Antikörper gefunden werden. Da in den SG-Färbungen RF-positive PC detektiert wurden, war dieses Ergebnis unerwartet. Allerdings wurden insgesamt nur 141 Antikörper getestet. Davon stammten lediglich 75 aus PC und nur maximal 33 aus einem Patienten. Die in den SG-Färbungen ermittelte Frequenz für RF-positive PC von maximal 1/200, zeigte jedoch, dass die Wahrscheinlichkeit, einen RF-positiven Antikörper in nur 141 Antikörpern zu finden, sehr gering ist. Allerdings wurde für MCV ein positiver Autoantikörper gefunden.

Die Produktion von Autoantikörpern im SG von Patienten mit RA wurde bereits in anderen Studien gezeigt. Neben RF-positiven PC [146,147], wurden auch solche mit anti-CCP-Spezifität beschrieben [99,155]. Dabei lag die Frequenz von CCP-reaktiven PC bei 1/4 bis 1/41 [99]. Die hier ermittelten Frequenzen liegen deutlich niedriger. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die hier durchgeführte Analyse individueller Antikörper

präziser ist als die Bestimmung der Frequenzen über Verdünnungen eines ELISPOT-Versuchs. Zum anderen treten starke Unterschiede in der Autoantikörper-Frequenz zwischen verschiedenen Patienten auf.

Die Affinitätsmessung des MCV-spezifischen Antikörpers zeigte, dass im SG hoch spezifische Antikörper gegen Auto-Ag gebildet werden können. Der Antikörper erreichte eine Affinität von ca. $5 \cdot 10^{-8}$ M. Dabei war die Assoziationskonstante relativ gering. Offensichtlich muss der Antikörper für die Erkennung von MCV eine Konformationsänderung durchlaufen. Diese Änderung benötigt Zeit, was sich auf die Assoziationskonstante auswirkt. Auf der anderen Seite bildet der Antikörper mit MCV einen sehr stabilen Komplex, der auch nach 8 Minuten kaum dissoziierte. Aus diesem Grund konnte nur keine Halbwertszeit der Dissoziation ermittelt werden. Wahrscheinlich liegt sie im Bereich mehrerer Stunden oder sogar Tage. Ebenso war es schwer, Werte für eine Dissoziationskonstante zu bestimmen. Die Konstanten in den unterschiedlichen Modellen unterschieden sich zum Teil in hohem Maße. Möglicherweise ist die Dissoziationskonstante geringer als ermittelt und die Affinität des Antikörpers zu MCV noch höher.

Affinitäten von Antikörpern bewegen sich im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-10} M [156]. Höhere Affinitäten sind nur sehr schwer zu selektionieren, da Antikörper, bei denen der Ag-Antikörper-Komplex eine sehr lange Halbwertszeit besitzt, nur sehr schwer von ihrem Ag dissoziieren. Auch eine niedrige Assoziationskonstante ist im Selektionsprozess benachteiligt, da Zellen mit einer hohen Assoziationskonstante ihr Ag sehr viel effektiver binden. Aus diesem Grund könnte der MCV-spezifische Antikörper außerhalb von Keimzentren generiert worden sein, wo die Selektionsbedingungen schwächer sind und keine Kontrollmechanismen die Bildung autoreaktiver Zellen verhindert. Die rudimentär im SG stattfindende SHM könnte zur Bildung solcher Antikörper führen. Das Vermehrte Auftreten von citrullinierten Proteinen im SG, aber nicht in sekundären lymphatischen Organen, könnte die Bildung von Citrullin-spezifischen Antikörpern bewirken. Dabei könnten Zellen durch Mutationen im Ig-Gen ihre Citrullin-Reaktivität herausbilden oder erhöhen. Auf diese Art könnten verschiedene Varianten von MCV-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen generiert werden, die durch das Fehlen eines FDC-Netzwerkes nicht notwendigerweise auf hohe Affinität selektioniert sein müssen. Allerdings würden in einer nächsten Aktivierungsrunde Gedächtnis-B-Zellen mit einer hohen Affinität zu MCV bevorzugt werden. Somit könnte sich ein Selektionsprozess über mehrere Generationen von aktivierten Gedächtnis-B-Zellen einstellen, der anders als der schnelle, kontrollierte Selektionsprozess an FDCs in herkömmlichen Keimzentren, hoch affine Antikörper mit ungewöhnlichen Assoziations- bzw. Dissoziationskonstanten entstehen lassen kann. Die Messung der Spezifität mittels ELISA zeigte, dass einige Antikörper reaktiv gegen mehrere Ag waren. Die meisten dieser Antikörper wurden auch im Polyreaktivitätstest als polyreaktiv erkannt. Dennoch waren nur etwa 33% der im ELISA-Test positiven Antikörper monospezifisch für das jeweilige Ag. Die Messung eines polyklonalen Antikörpers mit der Biacore-Methode zeigte keine Bindung an Insulin, gegen das der Antikörper im ELISA-Test stark reaktiv war. Offensichtlich erzeugt die Spezifitätsmessung im ELISA zum Teil Artefakte, die in der stringenteren Biacore-Methode nicht auftreten.

Sezernierung bakterienspezifischer Antikörper im SG

Neben Autoantikörpern werden bakterielle Infektionen als Ursache für RA angesehen, insbesondere von Parodontitis-auslösende Bakterien [142,143]. Deshalb wurde der Anteil an bakterienspezifischen Antikörpern im SG ermittelt, indem Antikörper gegen Parodontitis-auslösende Bakterien mit solchen gegen kommensale Bakterien verglichen wurden. Der Anteil an Parodontitiskoimen-spezifischen Antikörpern lag bei etwa 12%. Im Gegensatz dazu wurden kommensale Bakterien von weniger als 1% der Antikörper erkannt. Dieses Ergebnis liefert weitere Hinweise darauf, dass Parodontitis-auslösende Keime möglicherweise eine wichtige Rolle in der Pathogenese der RA spielen. Dennoch bleibt zu klären, ob die entsprechenden PC im SG generiert wurden oder als differenzierte PC in das SG eingewandert sind. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass sich Parodontitis-Keime im SG aufhalten. Neben Korrelationsstudien von Parodontitis und RA [143], wurde die DNA von solchen Keimen im SG mit aktiver Entzündung gefunden [144]. Das Vorhandensein solcher Keime im SG könnte zur lokalen Aktivierung spezifischer B-Zellen und letztlich zur Sezernierung von spezifischen Antikörpern führen. Jedoch wurde in der entsprechenden Arbeit nicht explizit ausgeschlossen, dass die DNA möglicherweise aus Makrophagen stammt, welche die Bakterien außerhalb des SG phagozytierten und dann ins SG einwanderten. Interessant ist der Befund, dass der Anteil an Antikörpern, die kommensale Bakterien erkennen, etwa 15 – 20-mal geringer ist als der für Parodontitis-auslösende Keime. PC gegen kommensale Bakterien werden hauptsächlich im Darm generiert. Dort aktivierte B-Zellen wechseln ihre Ig-Klasse meist zu IgA und exprimieren die Chemokin-Homing-Rezeptoren CCR9 (Dünndarm) [157,158,159] und CCR10 (verschiedene mukosale Gewebe, unter anderem Dickdarm) [157,158,160] und das Integrin $\alpha_4\beta_7$ [161,162], welche bewirken, dass solche PC immer wieder in den Darm zurückkehren [63]. Zudem fehlt IgA-PC der Chemokin-Homing-Rezeptor CXCR3 [163], welcher bewirkt, dass Immunzellen in Gewebe mit aktiven Entzündungen einwandern können [63]. Aus diesem Grund könnte es im SG zu einer selektiven Anhäufung von PC, die Parodontitis-Keime erkennen, kommen, da PC, die Antikörper gegen kommensale Bakterien sezernieren, weitaus weniger effizient ins SG einwandern sollten [63,69]. Allerdings besitzt das SG einen relativ hohen Anteil IgA-sezernierender PC. Der Antikörper, der spezifisch für den kommensalen Keim *Morganella morganii* war, exprimierte jedoch eine IgG3-schwere Kette, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass die PC eventuell nicht im Darm generiert wurde. Alle PC, die Parodontitis-Keime erkannten, stammten aus den Patienten B0114 und B0116, während die *Morganella morganii*-spezifische PC aus dem Patienten B0117 isoliert wurde. Dies weist darauf hin, dass entsprechende Keime nicht in allen Patienten eine Rolle bei der Pathogenese der RA spielen. Zusätzlich sind die Frequenzen spezifischer PC im SG zwischen verschiedenen Patienten sehr unterschiedlich, so dass das Vorhandensein von PC mit Spezifität gegen Parodontitis-Keime in Patient B0117 nicht ausgeschlossen werden kann.

Modell zur synovialen B-Zell-Antwort

Die hier diskutierten Daten liefern neue Erkenntnisse über die synoviale B-Zell-Antwort in SG ohne ektopische Keimzentren und führen zu folgendem Modell. Sowohl naive als auch Gedächtnis-B-Zellen können in das SG eindringen. Jedoch kommt es zu einer selektiven Anhäufung von Gedächtnis-B-Zellen. Die meisten dieser Zellen sammeln sich in B/T-Zell-Infiltraten an und können dort Ag-spezifisch aktiviert werden. Hinweise für eine Ag-spezifische Aktivierung geben a) die geringe Anzahl proliferierender B-Zellen, b) das veränderte V_H -Gen-Repertoire der PC, c) das häufige Auftreten klonal verwandter Zellen (klonale Expansion) d) die Hinweise für Selektion synovialer PC für bestimmte Ag und e) ein gleich großer Anteil polyreaktiver PC wie in gesunden Individuen. Während der Differenzierung der B-Zellen zu PC kommt es nur in einem geringen Maß zu Zellteilung, SHM und CSR. Da die Mehrzahl der synovialen PC hoch mutiert ist, weist dies auf eine bevorzugte Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen hin. Ausdifferenzierte PC migrieren daraufhin in die umliegenden Ass-PC-Bereiche und zum Teil auch in die Vas-PC-Regionen. Unterschiede im V_H -Gen-Repertoire, in der Mutationsfrequenz und in der CDR3-Länge zwischen Ass-PC und Vas-PC weisen auf Unterschiede in der Zusammensetzung beider PC-Populationen hin. Aus diesem Grund ist nicht ausgeschlossen, dass zusätzlich PC, die außerhalb des SG generiert wurden, ins SG einwandern und dort Antikörper sezernieren. Das Anhäufen sehr vieler klonal verwandter Sequenzen in Gedächtnis-B-Zellen und PC sowie das Auftreten von identischen Klonen mit unterschiedlichen Ig-Klassen sprechen allerdings dafür, dass die Mehrzahl der Vas-PC im SG generiert worden sind. Trotz der nur rudimentären SHM können synoviale PC hoch affine Autoantikörper sezernieren, die einen maßgeblichen Einfluss auf die Chronizität und die Stärke der Entzündungsreaktion haben können. Vor diesem Hintergrund wäre es interessant zu analysieren, ob Autoantikörper von lokalen langlebigen PC generiert werden oder durch kurzlebige PC, die sequenziell aus aktivierten Gedächtnis-B-Zellen generiert werden. Ein Vergleich des Expressionsprofils synovialer PC mit langlebigen PC aus dem Knochenmark und kurzlebigen PC aus dem Blut könnte helfen, diese Frage zu beantworten.

Material

Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Tab. 8: benötigte Verbrauchsmaterialien und Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge.

Material	Firma
Agarose	Q BioGene
Agar Select	Sigma
Ampicillin	Sigma
BioSpin-Säulchen	Biorad
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Sigma
CapSure LCM Caps Macro & HS	Arcturus
DAPI (4-,6-diamidino-2-phenylindole)	Sigma
Deckgläser	Roth
DEPC	Sigma
DNA-Marker GeneRuler 100bp	Fermentas
Einbettmedium Tissue-Tek O.C.T.	Sakura
ELISA-Platten	Costar
Fettstift	DAKO
Ficoll	PAA Laboratories
FluoromountG	Sigma
Gefrierschalen Tissue-Tek	Sakura
Glycerin	Merck
Hep2-Objektrträger	Bios Labordiagnostik
Insulin	Sigma
LPS	Sigma
Mikrotom-Messer	Micron
Bakterien-Nährlösung YT Broth	Bio 101
Nutridoma SP	Roche
Objektrträger SuperfrostPlus	Menzel
PCR-Gefäße 0,2ml 8ter Streifen	Roth
PCR-Gefäße 0,5ml	Biometra
Polyethylenimine (PEI)	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Peroxidase Substrat	Biorad
Pipettenspitzen	Grainer
Pipettenspitzen, gestopft	Biozym
PrepStrip Tissue Preparation Strips	Arcturus
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15ml, 50ml)	Corning
RNase AWAY	Molecular Bio Products
Parafilm	American National Can
ProteinG beads	GE healthcare
Sequenzierungspuffer	Applied Biosystems
Zellkulturschalen, Ø145mm	Greiner bio-one
Zellsieb	BD Falcon

Alle weiteren Chemikalien wurden von der Firma Roth bezogen.

Enzyme

Tab. 9: benötigte Enzyme in alphabetischer Reihenfolge.

Enzym	Firma
Agel	Fermentas
AmpliTaQ Gold	Applied Biosystems
BsiWI	New England Biolabs
CollagenaseD	Roche
ExoSAP-IT	USB Corporation
Reverse Transkriptase Sensiscript; Omniscript; one-step	Qiagen
RNase Inhibitor RiboLock	Bioline
Sall	Fermentas
T4 Ligase	Fermentas
XhoI	Fermentas

Zellen, Bakterien, Vektoren

Tab. 10: benötigte Zellen, Bakterien und Vektoren in alphabetischer Reihenfolge.

Zellelinie, Bakterienstamm, Vektor	Firma
E.coli DH10B	Clontech
E.coli TOP10F'	Invitrogen
Expressionsvektor γ 1HC; κ LC; λ LC	MPI für Infektionsbiologie, AG Wardemann
HEK 293T Zellen	MPI für Infektionsbiologie, AG Wardemann
pCR2.1 TOPO Vektor	Invitrogen

Antikörper

Tab. 11: benötigte Antikörper für Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie in alphabetischer Reihenfolge.

	Name	Klon	Firma	Verdünnung
Primäre Antikörper	Maus anti-human CD4	MT310	DAKO	1/50
	Maus anti-human CD8	DK25	DAKO	1/50
	Maus anti-human CD19-APC/Cy7	SJ25C1	BD Pharmingen	1/20
	Maus anti-human CD20	L26	DAKO	1/100
	Maus anti-human CD27-Cy5	2E4	DRFZ	1/100
	Maus anti-human CD31	JC/70A	DAKO	1/100
	Maus anti-human CD38-FITC	HIT2	BD Pharmingen	1/20
	Maus anti-human CD55	MCA1614	Serotec	1/100
	Maus anti-human CD68	EBM11	DAKO	1/100
	Maus anti-human HLA-DR-Cy5	L243	DRFZ	1/20
	Maus anti-human fDC	Wue-2	Uni Würzburg	1/100
	Maus anti-human Plasmazellen-A488	Wue-1	DRFZ	1/100
	Kaninchen anti-human Ki67	(polyklonal)	Dako	1/100
Sekundäre Antikörper	Ziege anti-Maus-A488		Invitrogen	1/500
	Ziege anti-Maus-A546		Invitrogen	1/500
	Ziege anti-Kaninchen-A546		Invitrogen	1/500
	Ziege anti-human-HRP		Jackson	1/1000
	Ziege anti-human-Cy3		Jackson	1/500

Oligonukleotide

Tab. 12: benötigte Primer

Reaktion	Name	5' - 3'-Sequenz	
HC 1. PCR	5' L-VH Mix:		
	5' L-VH 1	ACAGGTGCCCACTCCAGGTGCAG	
	5' L-VH 3	AAGGTGTCCAGTGTGARGTGCAG	
	5' L-VH 4/6	CCCAGATGGGTCTGTCCAGGTGCAG	
	5' L-VH 5	CAAGGAGTCTGTTCCGAGGTGCAG	
	3' CH Mix:		
	3' C μ CH1	GGGAATTCTCACAGGAGACGA	
	3' C γ CH1	GGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTC	
	3' C α CH1	TGGGAAGTTTCTGGCGGTACG	
HC 2.PCR	VH Mix:		
	5' VH2	AGATCACCTGAAGGAGTCTGG	(TIB Molbiol)
	5' VH3	GTGCAGCTGGTGSAGTCTGG	(TIB Molbiol)
	5' VH4	AGGTGCAGCTGCAGGAGTCG	(TIB Molbiol)
	5' VH4N	AGGTGCAGCTGCAGGAGTCG	(TIB Molbiol)
	5' VH6	CAGCTGCAGCAGTCAGGTCC	(TIB Molbiol)
	CH Mix:		
	3' γ -HC	GAGGCGCCAGGGGAAGAC	(TIB Molbiol)
	3' α -HC	GAGGCTCAGCGGAAGACCTTG	(TIB Molbiol)
	3' μ -HC	ACGGGGAATTCTCACAGGAGAC	(TIB Molbiol)
HC spezifisch PCR	5' Agel VH1	CTGCAACCGGTGTACATTCACAGGTGCAGCTGGTGCAG	
	5' Agel VH1/5	CTGCAACCGGTGTACATTCAGAGGTGCAGCTGGTGCAG	
	5' Agel VH1-18	CTGCAACCGGTGTACATTCACAGGTTCAGCTGGTGCAG	
	5' Agel VH1-24	CTGCAACCGGTGTACATTCACAGGTCCAGCTGGTACAG	
	5' Agel VH3	CTGCAACCGGTGTACATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAG	
	5' Agel VH3-9	CTGCAACCGGTGTACATTCTGAAGTGCAGCTGGTGGAG	
	5' Agel VH3-23	CTGCAACCGGTGTACATTCTGAGGTGCAGCTGTTGGAG	

Reaktion	Name	5'-3'-Sequenz	
κLC 1.PCR	5' Agel VH3-33	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCTCAGGTGCAGCTGGTGGAG	
	5' Agel VH4	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAG	
	5' Agel VH4-34	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTG	
	5' Agel VH4-39	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAG	
	5' Agel VH6-1	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCCCAGGTACAGCTGCAGCAG	
	3' Sall JH 1/2/4/5	TGCGAAGT <u>CGAC</u> GCTGAGGAGACGGTGACCAG	
	3' Sall JH 3	TGCGAAGT <u>CGAC</u> GCTGAAGAGACGGTGACCATTG	
	3' Sall JH 6	TGCGAAGT <u>CGAC</u> GCTGAGGAGACGGTGACCCTG	
	5' L-Vk Mix:		
	5' L Vk 1/2	ATGAGGSTCCYGGCTCAGCTGCTGG	
κLC 2.PCR	5' L Vk 3	CTTTCTCTGCTACTCTGGCTCCAG	
	5' L Vk 4	ATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTG	
	3' Ck 543	GTTTCTCGTAGTCTGCTTTGCTCA	
κLC 2.PCR	5' Pan Vk	ATGACCCAGWCTCCABYCWCCCTG	
	3' Ck 494	GTGCTGTCCTTGCTGCTCTGCT	
κLC spezifische PCR	5' Agel Vk 1-5	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCTGACATCCAGATGACCCAGTC	
	5' Agel Vk 1-9	TTGTGCTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTGACATCCAGTTGACCCAGTCT	
	5' Agel Vk 1D-43	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTGTGCCATCCGGATGACCCAGTC	
	5' Agel Vk 2-24	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATGGGGATATTGTGATGACCCAGAC	
	5' Agel Vk 2-28	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATGGGGATATTGTGATGACTCAGTC	
	5' Agel Vk 2-30	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATGGGGATGTTGTGATGACTCAGTC	
	5' Agel Vk 3-11	TTGTGCTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTGAGAAATTGTTGACACAGTC	
	5' Agel Vk 3-15	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTGAGAAATTGTTGATGACGAGTC	
	5' Agel Vk 3-20	TTGTGCTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTGAGAAATTGTTGACGAGTCT	
	5' Agel Vk 4-1	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTGCGACATCGTGATGACCCAGTC	
	3' BsiWI Jk 1/4	GCCACCGTACGTTTGATYTCACCTTGGTC	
	3' BsiWI Jk 2	GCCACCGTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTC	
	3' BsiWI Jk 3	GCCACCGTACGTTTGATATCCACTTTGGTC	
	3' BsiWI Jk 5	GCCACCGTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTC	
λLC 1.PCR	5' L Vλ 1	GGTCCTGGGCCAGTCTGTGCTG	
	5' L Vλ 2	GGTCCTGGGCCAGTCTGCCCTG	
	5' L Vλ 3	GCTCTGTGACCTCTATGAGCTG	
	5' L Vλ 4/5	GGTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTG	
	5' L Vλ 6	GTTCTTGGGCCAATTTATGCTG	
	5' L Vλ 7	GGTCCAATTCYAGGCTGTGGTG	
	5' L Vλ 8	GAGTGGATTCTCAGACTGTGGTG	
	3' Cλ	CACCAAGTGTGGCCTTGTGGCTTG	
λLC 2.PCR / spezifische PCR	5' Agel Vλ 1	CTGCT <u>ACCGGT</u> TCTCTGGGCCAGTCTGTGCTGACKCAG	
	5' Agel Vλ 2	CTGCT <u>ACCGGT</u> TCTCTGGGCCAGTCTGCCCTGACTCAG	
	5' Agel Vλ 3	CTGCT <u>ACCGGT</u> TCTGTGACCTCTATGAGCTGACWCAG	
	5' Agel Vλ 4/5	CTGCT <u>ACCGGT</u> TCTCTCTCSCAGCYTGTGCTGACTCA	
	5' Agel Vλ 6	CTGCT <u>ACCGGT</u> TCTTGGGCCAATTTATGCTGACTCAG	
	5' Agel Vλ 7/8	CTGCT <u>ACCGGT</u> TCCAATTCYAGRCTGTGGTGACYCAG	
	3' XhoI Cλ	CTCCTCACTCGAGGGYGGGAACAGAGTG	
Sequenzierung / Screening-PCR	5' Ab sense	GCTTCGTTAGAACGCGGCTAC	
	3' IgG internal	GTTCCGGGGAAGTAGTCCTTGAC	
	JH total	CTGARGAGACRGTGACC	(TIB Molbiol)
	Vk Mix:		
	Vk1	CATCCAGWTGACCCAGTCTCC	(TIB Molbiol)
	Vk2b	GATRTTGTGATGACTCAGTCTCC	(TIB Molbiol)
	Vk2/4/6	TATTGTGATGACCCAGACTCC	(TIB Molbiol)
	Vk3	CTKTGTCTCCAGGGGAAAGAG	(TIB Molbiol)
	Vk5	AACCACACTCACGCACTCTCC	(TIB Molbiol)
	Jk Mix:		
	Jk1/4	CGTTTGATYTCACCTTGGTCC	(TIB Molbiol)
	Jk2	CGTTTGATCTCCAGCTTGGTCC	(TIB Molbiol)
	Jk3	ACGTTTGATATCCACTTTGGTCC	(TIB Molbiol)
	Jk5	CGTTTAATCTCCAGCTGTGTC	(TIB Molbiol)
	Ck110	AAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCAC	(TIB Molbiol)
	Vλ Mix:		
	Vλ1	GTCTGTGTTGACGCAGCCGC	(TIB Molbiol)
	Vλ2	CAGTCTGCCCTGACTCAGCC	(TIB Molbiol)
	Vλ3a	CTATGTGCTGACTCAGCCACC	(TIB Molbiol)
	Vλ3b	CTTCTGAGCTGACTCAGGACC	(TIB Molbiol)
	Vλ4b	GCTTGTGCTGACTCAATCGCC	(TIB Molbiol)
	Vλ7/8	GACTGTGGTGACYCAGGAGC	(TIB Molbiol)
	Jλ Mix:		
	Jλ1	AGGACGGTGACCTTGGTCCC	(TIB Molbiol)
	Jλ2/3/7	CCTAGGACGGTCAGCTKGG	(TIB Molbiol)

Primer wurden von den Firmen TIB Molbiol (gekennzeichnet) bzw. Invitrogen bezogen.
Restriktionsschnittstellen wurden unterstrichen.

Kits

Tab. 13: benötigte Kits in alphabetischer Reihenfolge.

Kit	Firma
ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Amino-coupling Kits	Biacore
AmpliTaq Gold Kit	Applied Biosystems
AP-Substrat-Kit	Vector Laboratories
GeneChip 3' Amplification for IVT Labeling Kit	Affymetrix
GeneChip Hybridization Control Kits	Affymetrix
HistoGene LCM Frozen Section Staining Kit	Arcturus
HistoGene LCM Immunofluorescence Staining Kit	Arcturus
Nucleospin Extract II	Macherey-Nagel
Nucleospin Plasmid Kit	Macherey-Nagel
Nucleospin RNA II Kit	Macherey-Nagel
PicoPure RNA Isolations-Kit	Arcturus
POD-Substrat Fast Red	Sigma
RiboAmp HS Plus 1,5-Round	Arcturus
RNA 6000 Nano Reagents and Supply Kit,	Agilent
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen

Geräte

Tab. 14: benötigte Geräte in alphabetischer Reihenfolge.

Gerät	Firma
BIAcore 2000	Bacore
Bioanalyzer 2100	AlphaMettroX Biotech
Gelelektrophoresekammern	Biorad
Gen-Expressions-System	Affymetrix
Heizblock	Techne
Mikrodissektionsmikroskop Veritas LCM 702	Arcturus
Mikroskop Axiophot	Zeiss
Mikroskop Kamera Spot RT	Diagnostic Instruments
Mikrotom HM 500 OM	Microm
PCR T Personal	Biometra
Photometer NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific
Pipetten	Gilson
Rotator STR4	Stuart
Sequenzierer Abi Prism 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer Applied Biosystems
SpectraMax 190	Molecular Devices
Vakuuszentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf
Vortexer	Scientific Industries
Zentrifugen	Heraeus

Software

Tab. 15: benötigte Software in alphabetischer Reihenfolge.

Programm	Firma
ABI Sequence Analysis	Perkin Elmer Applied Biosystems
Biaevaluation v4.1	Biacore
Endnote X	Wintertree Software
Flowjo	Tree Star
GCOS 1.1	Affymetrix
GraphPad Prism4	GraphPad software
Illustrator CS	Adobe
Image Tools	UTHSCSA
MetaView	Metaview
Microarray Suite v5.0	Affymetrix
MS-Office	Microsoft
Photoshop CS	Adobe
Reference Manager 11	Thomson ISI ResearchSoft
SigmaPlot	Systat software
Softmax Pro	Molecular Devices
Vector NTI	Infomax
Veritas Operating Software v.2.3.2.2	Arcturus

Methoden

Patienteninformationen

Die Gewebeproben der Patienten B002, B0029 und B0032 wurden von Dr. Thomas Häupl (Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie; Charité Campus Mitte) zur Verfügung gestellt und stammen aus dem Helios Klinikum Berlin Buch (Prof. Dr. med. Josef Zacher; Orthopädie und orthopädische Rheumatologie). Die Patienten B0114, B0116 und B0117 stammen ebenfalls aus der Orthopädie und orthopädischen Rheumatologie des Helios Klinikums. Alle Patienten erfüllen die Kriterien der Arthritis and Rheumatism Association für Rheuma [89].

Tab. 16: Patienteninformationen.

Patient	B0002	B0029	B0032	B0112	B0114	B0116	B0117
Alter	69	73	62	54	70	67	51
Geschlecht	W	M	W	M	W	W	W
Alter beim Einsetzen der RA	61	67	58	37	47	61	38
Länge der RA (Jahre)	8	6	4	17	23	7	13
OP Gelenk				HG re	EB li	HG li	SG li
Steroide/NSAR/Analgetika	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Nein	Ja
Glycokortikoide system. (mg)	Ja (5)	Ja (5)	Nein	Ja	Ja (5)	Ja (7,5)	Ja (10)
MTX	1	5	5	Nein	1	5	Nein
RF	n.g.	n.g.	47	n.g.	+	+	n.g.
Anti-CCP	n.g.	n.g.	1363	n.g.	+	n.g.	n.g.
Rhöntgen-Veränderungen	Nein	Ja	Ja	Ja	n.g.	n.g.	n.g.
DAS28	5,192	4,477	5,291	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
CRP (mg/dl)	3,62	1,54	2,5	0,26	10,42	0,13	0,28

W: weiblich; M: Männlich; EB: Ellenbogen; HG: Handgelenk; SG: Sprunggelenk; li: links; re: rechts; RF: Rheumafaktor; CCP: cyclisches citrinuliertes Peptid; DAS28: Krankheits-Aktivitäts-Maß (Disease Activity Score) auf der Grundlage von 28 Gelenken; CRP: C-reaktives Protein; n.g.: nicht getestet

Histologie

Anfertigen mikroskopischer Schnitte

Die synovialen Gewebeproben wurden in Gefrierschalen (*Tissue-Tek Cryomold*, Sakura) mit Einbettmedium *Tissue-Tek O.C.T.* (Sakura) eingebettet und auf Trockeneis schockgefroren und anschließend bei -70°C gelagert. Mit dem Mikrotom *HM 500 OM* (Microm) wurden 7µm dicke Schnitte hergestellt, auf *SuperfrostPlus*-Objektträger (Menzel) aufgenommen und direkt nach dem Schneiden auf Trockeneis zwischengelagert, um RNA-Degradation zu minimieren. Die Schnitte wurden mit Kalziumchlorid bei -70°C gelagert. Die Mikrodissektion erfolgte innerhalb von maximal 3 Monaten nach dem Anfertigen der Gewebeschnitte.

Immunofluoreszenz

Die benötigten Antikörper wurden in PBS/0,1%BSA verdünnt (Tab.11). Die Schnitte wurden in -20°C kaltem Aceton für 10min fixiert, an der Luft getrocknet und anschließend für 20min in PBS/3%BSA blockiert. Das Gewebe wurde mit Primärantikörpern für 60 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend 3-mal für 5 min in PBS/0,1% BSA gewaschen. Bei der Verwendung von ungekoppelten Primärantikörpern wurden die Gewebsschnitte mit Sekundärantikörpern für 30 min bei RT inkubiert und 3-mal für 5 min in PBS/0,1%BSA gewaschen. Das Anfärben der Zellkerne mittels 4-,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) erfolgte durch hinzupipetieren von 10 µl DAPI (5µg/ml) in den letzten 5min der Inkubationszeit der sekundären Antikörper. Nach dem erneuten Waschen in PBS/0,1% BSA wurden die Schnitte in 100 µl FluoromountG eingedeckelt und bei 4 °C aufbewahrt. Das Aufnehmen der Bilder erfolgte mittels einer *SPOT RT Kamera* (Diagnostic Instruments) an einem *Axiophot* Mikroskop (Zeiss).

Immunhistochemie

Die Behandlung der Gefrierschnitte und die Inkubation der Primärantikörper erfolgte analog zur Immunofluoreszenz-Färbung (Abschnitte: 6.2.2). Die Detektion der Primärantikörper (mouse anti-CD31, mouse anti-CD20, Wue-1-bio) erfolgte mit goat anti-mouse labeled polymer-AP (DAKO) bzw. Streptavidin-POD. Nach 5 minütigem Waschen wurden die Maus-Antikörper für ca. 15 min mit dem AP-Substrat (Vector Laboratories) entwickelt. Nach erneutem 5minütigem Waschen erfolgte die Färbereaktion des biotinylierten Wue-1 Antikörpers mit POD-Substrat (Sigma). Anschließend wurden die Schnitte erneut 5 min gewaschen und für ca. 10 s mit Hämatoxilin gegengefärbt und mit Leitungswasser gebläut. Das Eindeckeln erfolgte in Glycerin.

Analyse des V-Gen Repertoires mittels Laser-unterstützter Mikrodisektion

Fluoreszenzfärbung für Laser-unterstützte Mikrodisektion

Um RNA-Degradation zu minimieren, wurden alle Oberflächen und Geräte mit *RNase AWAY* (Molecular Bio Products) vorbehandelt. Antikörper-Verdünnungen wurden in dem RNase-freien Puffersystem des *HistoGene LCM Immunofluorescence Staining Kit* (Arcturus) angesetzt. Zusätzlich wurden alle Schritte zügig hintereinander durchgeführt.

Auf -70 °C eingefrorene Schnitte wurden direkt für 2min in -20 °C kaltem Aceton fixiert und anschließend luftgetrocknet. Daraufhin wurde der Plasmazell-spezifische Antikörper Wue-1-Alexa488 (1/10 verdünnt) für 4min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in einer Ethanol-Reihe (70%, 95%, 100%) für jeweils 30 s und in Xylol für 5 min dehydriert. Die so gewonnenen Schnitte wurden direkt und innerhalb von maximal 3h mikrodisektiert.

Auf Grund der angestrebten kurzen Färbezeit und der Tatsache, dass der B-Zell-spezifische Antikörper anti-CD20 nur ungekoppelt erhältlich ist, wurde die anschließende Mikrodissektion anhand des Wue-1 Antikörpers durchgeführt.

Laser-unterstützte Mikrodissektion (Laser capture microdissection, LCM)

Die Mikrodissektion erfolgte auf dem *Veritas LCM Mikroskop* (Arcturus) mittels *CapSure HS Caps* (Arcturus). Um einen Laser-Punkt-Durchmesser von 7-8 μm zu erreichen, wurden die Energie und die Pulslänge des Lasers individuell für jeden Schnitt eingestellt. Die Durchschnittswerte für die Laserenergie lagen bei etwa 60 bis 80 mW und die Pulslänge bei 2000 bis 3000ms.

Plasmazellen wurden mittels des Wue-1 Antikörpers direkt identifiziert und als Gruppen aus Einzelzellen isoliert. Da B-Zell-Infiltrate innerhalb des kurzen Färberahmens nicht direkt angefärbt werden konnten, wurden sie anhand konsekutiver Schnitte identifiziert, die mittels des Immunofluoreszenz-Protokolls (Abschnitt 6.2.) angefärbt wurden. Während der Mikrodissektion wurden diese Schnitte verwendet, um B-Zell-Infiltrate als Zellkern-reiche Flächen innerhalb charakteristischer Plasmazell-Ringe zu identifizieren. B-Zell-Infiltrate wurden mikrodissektiert, indem mehrere kleine Flächen von ca. 20 bis 30 Zellen (1500 bis 2500 μm^2) isoliert wurden.

Um koisolierte Zellen zu entfernen, wurde die Cap-Oberfläche auf sterile *PrepStrip tissue preparation strips* (Arcturus) gedrückt. Die mit Zellen behafteten Caps wurden mit 40 μl XB-Puffer des *PicoPure RNA Isolation Kits* (Arcturus) bedeckt und bei 4 °C aufbewahrt, bis die Mikrodissektion abgeschlossen war.

Nach erfolgter Mikrodissektion wurde das Restgewebe zur Ermittlung der RNA-Integrität mit 40 μl XB-Puffer abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt.

RNA Gewinnung und Bestimmung der RNA Integrität

Alle Oberflächen und Geräte wurden mit *RNase AWAY* (Molecular Bio Products) vorbehandelt. Die RNA-Isolierung wurde mit Hilfe des *PicoPure RNA Isolation Kits* (Arcturus) anhand des mitgelieferten Protokolls durchgeführt. Die RNA wurde in 13 μl Elutionspuffer eluiert und unverzüglich in cDNA umgeschrieben (Abschnitt 6.3.5).

Um die RNA Integrität zu bestimmen, wurde die RNA der Probe des Restgewebes ebenfalls mit dem *PicoPure RNA Isolation Kit* (Arcturus) isoliert. Die eluierte RNA wurde mittels der Vakuumzentrifuge *Concentrator 5301* (Eppendorf) auf ein Endvolumen von 2 μl aufkonzentriert. Zur Analyse der RNA wurden etwa 100 ng Probe für 2 min bei 70 °C erhitzt, auf einen Mikrochip gegeben und mit dem *Bioanalyzer 2100* (Agilent) analysiert. Für die synovialen Gewebeproben wurde eine RNA-Integrations-Zahl (RIN) zwischen 5,7 und 6,9 ermittelt.

Reverse Transkriptase Reaktion und PCR Amplifikation

Die cDNA der rearrangierten Ig-Gene wurde mit Hilfe des *Sensiscript RT Kit* (Qiagen) synthetisiert. Es wurden drei spezifische Primer benutzt, die an die konstante Kette von IgM (3' μ -HC), IgG (3' γ -HC) und IgA (3' α -HC)

binden. Der Reverse Transkriptase-Ansatz umfasste 13 µl RNA, je 1 µl Primer, 2 µl RT-Puffer, 1 µl dNTPs, 1 µl Sensiscript Reverse Transkriptase und 0,3 µl RNase Inhibitor (40 U/µl; Bioline). Die Reaktion wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die Enzyme für 10 min bei 65 °C inaktiviert.

Die darauffolgende Amplifikation der Ig-Gene erfolgte mit Hilfe des *AmpliTaQ Gold Kits* (Applied Biosystems). Für die Amplifikation wurde der VH-Mix und die drei spezifischen Primer für die konstante Kette 3'µ-HC, 3'γ-HC und 3'α-HC benutzt. Der Reaktionsansatz setzte sich aus je 1 µl Primer, 3,5 µl cDNA, 2,5 µl 10 x Puffer, 2,5 µl dNTPs, 2 µl MgCl₂, 0,4 µl AmpliTaQ Gold und 7,1 µl H₂O zusammen. Das Programm umfasste einen initialen Denaturierungsschritt von 95°C für 10min, gefolgt von 50 Zyklen bestehend aus 95 °C für 30 s, 68 °C für 30 s und 72 °C für 40 s und einem terminalen Elongationsschritt von 72 °C für 10 min. Die Amplifikation erfolgte in einem *T personal Thermocycler* (Biometra).

Gelelektrophorese und Gelextraktion

Für die präparative Auftrennung von PCR-Produkten wurde 2%ige *NuSieve GTG Agarose* (Camprex) benutzt. Die Gelelektrophorese erfolgte in TBE-Puffer. Mit Hilfe von Einmal-Minilanzellen wurden Banden im Bereich von 350 bp ausgeschnitten.

Anschließend wurden die PCR-Fragmente Hilfe des *NucleoSpin Extract II Kit* (Macherey-Nagel) aufgereinigt. Die Extraktion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers und wurde in 20 µl Elutionspuffer eluiert.

TOPO TA-Klonierung, Transformation und Plasmid-Präparation

Die Klonierung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem *TOPO TA Cloning Kit* (Invitrogen). Dieses Kit nutzt die Eigenschaft des Ligierens der Topoisomerase I, die kovalent an den 3'-Phosphat-Enden eines linearisierten TOPO Vektors gebunden ist.

Der Ligationsansatz umfasste 0,8 µl aufgereinigtes PCR-Produkt, 0,5 µl Salzlösung und 0,2 µl pCR2.1 TOPO Vektor und 1,5 µl H₂O. Dieser Ansatz wurde 8 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Transformation wurden 2 µl des Ligationsansatzes zu 15 µl Bakterien des Stamms E. coli TOP10F' (*TOPO TA Cloning Kit*) gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte die Inkubation der Ansätze für genau 30 s bei 42 °C und eine weitere Inkubation auf Eis für 2 min. Anschließend wurden 50 µl SOC- Medium (*TOPO TA Cloning Kit*) zu den Bakterien gegeben und die Kulturen für 60 min bei 37 °C und 200 UpM geschüttelt. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf Nähragar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Auswahl transformierter Bakterienklone mit integriertem Fragment wurde durch Blau-Weiß-Selektion getroffen. Dazu enthält der YT-Agar (YT Broth (Bio 101), 15% Agar Select (Sigma), 50 µg/ml Ampicillin (Sigma)) zusätzlich 64 µg/ml Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) und 50 µg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal). Pro Ansatz wurden acht zufällig ausgewählte positive (weiße) Bakterienklone isoliert und in 2 ml flüssiger Nährlösung (YT Broth (Bio 101), 50 µg/ml Ampicillin (Sigma)) über Nacht bei 37 °C und 200 UpM vermehrt.

Die Plasmid-DNA der 2 ml-Übernachtskulturen wurde unter Verwendung des *NucleoSpin Plasmid Kits* (Macherey-Nagel) isoliert. Die Isolierung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die DNA wurde in 30 µl Elutionspuffer eluiert.

Sequenzierungsreaktion und Ethanol-Fällung

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem *ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) durchgeführt. Das System nutzt die klassische enzymatische Methode nach Sanger [164]. Für die Sequenzierung wurde ein Primer verwendet, der im pCR2.1 TOPO Vektor bindet (-40 TOPO). Der Reaktionsansatz setzte sich aus 3,5 µl Plasmid DNA, 0,5 µl Primer, 2 µl Sequenzierungspuffer, 0,8 µl Big Dye und 3,2 µl H₂O zusammen. Die Amplifikation umfasste 40 Zyklen mit 96 °C für 10 s, 45 °C für 5 s und 60 °C für 4 min, sowie Abkühlung auf 4 °C in einem *T personal Thermocycler* (Biometra).

Die Sequenzreaktion wurde anschließend durch Ethanol-Fällung gereinigt. Dazu wurden zu jeder Reaktion 80 µl H₂O, 10 µl 3M Natriumacetat pH4,5 und 250 µl 100% Ethanol gegeben, die Reaktionsmischung gevortext und 20 min bei 11000 g zentrifugiert. Daraufhin wurde das Präzipitat mit 350 µl 70% Ethanol gewaschen, erneut für 10 min bei 11000 g zentrifugiert und anschließend bei 50°C getrocknet und in 20 µl H₂O aufgenommen.

Die Auftrennung und Detektion der Sequenzierungsprodukte erfolgte in einem *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

Auswertung der Sequenzen

Um die V_H-, D- und J_H-Segmente zu identifizieren, wurden die Programme *Ig-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) und *V BASE Sequence Directory* (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) herangezogen. Wurden mehrere Keimbahn D-Segmente mit ähnlicher Homologie zur sequenzierten Probe gefunden, wurden die entsprechenden D-Segmente mit spg (several possible genes) bezeichnet. Die CDR3-Länge wurde zwischen den Aminosäuren der Position 94 und 103 (konserviertes Tryptophan in allen J_H Segmenten) gemessen. Für die Bestimmung der Mutationen wurden die Keimbahn V_H-Segmente mit der höchsten Homologie zur sequenzierten Probe herangezogen. Dabei wurden nur Mutationen berücksichtigt, die bis zur Aminosäure-Position 94 (Ende der FR3) auftraten.

Ermittlung der Spezifität synovialer B-Lymphozyten

Kollagenase-Verdau von Synovialgewebe

Frische synoviale Gewebebiopsien wurden in DMEM-Medium auf Eis unverzüglich vom Helios Klinikum Berlin Buch (Orthopädie und orthopädische Rheumatologie) zum DRFZ transportiert. Daraufhin wurden synoviale Gewebezotten von Fett- und Bindegewebe getrennt. Ein Teil der Synovialzotten wurde mit dem Einbettmedium *Tissue-Tek O.C.T.* (Sakura) eingebettet, auf Trockeneis schockgefroren und für spätere

histologische Untersuchungen bei -70 °C gelagert. Der Rest des Gewebes wurde in DMEM-Medium in kleine Stückchen (max. 1 mm³) geschnitten und bei 500g (1400rpm) für 7 min bei 4 °C in einer *Multifuge 1S-R* (Heraeus) abzentrifugiert. Daraufhin wurden die Gewebeschnipsel in 1ml DMEM und *CollagenaseD* (Roche) (Endkonzentration: 0,5 mg/ml) resuspendiert und für 90 min bei 37 °C in einem Schüttelinkubator (200 Upm) inkubiert.

Die so gewonnene Suspension wurde mittels einem 70 µm-Sieb (BD Pharmingen) von größeren Gewebestücken getrennt und mit PBS gewaschen. Durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation wurde die Suspension von Fibroblasten, Fettzellen und Erythrozyten getrennt und mononukleäre Zellen angereichert. Dazu wurden 35 ml Zellsuspension in PBS auf 15 ml Ficoll (PAA Laboratories) aufgeschichtet und in einer *Multifuge 1S-R* für 20 min bei 850 g (2000 Upm) und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Mononukleäre Zellen in der Interphase wurden abgezogen und in 50 ml PBS/0,1 % BSA aufgenommen und anschließend durch einen Zentrifugationsschritt für 7 min bei 500 g (1400 rpm) und 4 °C gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 210 µl PBS/0,1 % BSA aufgenommen.

Einzelzellsortierung mittels Durchflusszytometrie

Von den so gewonnenen synovialen mononukleären Zellen wurden 10 µl für eine ungefärbte Kontrollprobe abgenommen. Die restlichen 200 µl wurden für 10 min bei 4 °C mit 2 µl anti-CD16/anti-CD32 (Miltenyi Biotec) blockiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit Antikörpern gegen CD19, CD38 und CD27 (Tab.11) bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurden die gefärbten Zellen und die ungefärbte Probe mit PBS/0,1% BSA durch ein 30 µm-Sieb (Miltenyi Biotec) gespült und für 7 min bei 500 g (1400 Upm) und 4 °C abzentrifugiert. Beide Proben wurden in 500 µl PBS/0,1% BSA gründlich resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt.

Die Zellsortierung erfolgte auf einem FACS Diva (BD Biosciences). Vor der Messung wurde zu den Proben 1µl 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) gegeben um tote Zellen sichtbar zu machen. Es erfolgte die Sortierung von naiven B-Zellen (CD19⁺, CD27⁻, CD38⁻), Gedächtnis B-Zellen (CD19⁺, CD27⁺, CD38⁻) und Plasmazellen (CD19⁺, CD27⁺, CD38⁺). Je eine Zelle wurde in eine Vertiefung einer 96-well-Platte sortiert, wobei pro Zellpopulation eine Platte gefüllt wurde. Die Vertiefungen der Platten wurden vor der Sortierung mit 20 µl 2,5-fach RT-Puffer (*OneStep RT-PCR Kit*; Qiagen) befüllt, um das Austrocknen der Einzelzellen zu verhindern. Vollständig befüllte Platten wurden für 7 min bei 500 g (1400Upm) und 4 °C in einer *Multifuge 1S-R* (Heraeus) abzentrifugiert und bei -70 °C gelagert.

Reverse Transkriptase-Reaktion und PCR-Amplifikation (1. PCR) der Immunglobulin-Gene

Die gesamte Amplifikations-Strategie ist in Abb. 24 beschrieben. Die Reverse Transkription und primäre Amplifikation der Immunglobulin-Gene wurde mit dem *OneStep RT-PCR Kit* (Qiagen) durchgeführt. Dieses Kit ermöglicht eine Primer-vermittelte Transkription von RNA mit anschließender Amplifikation in einem Reaktionsansatz.

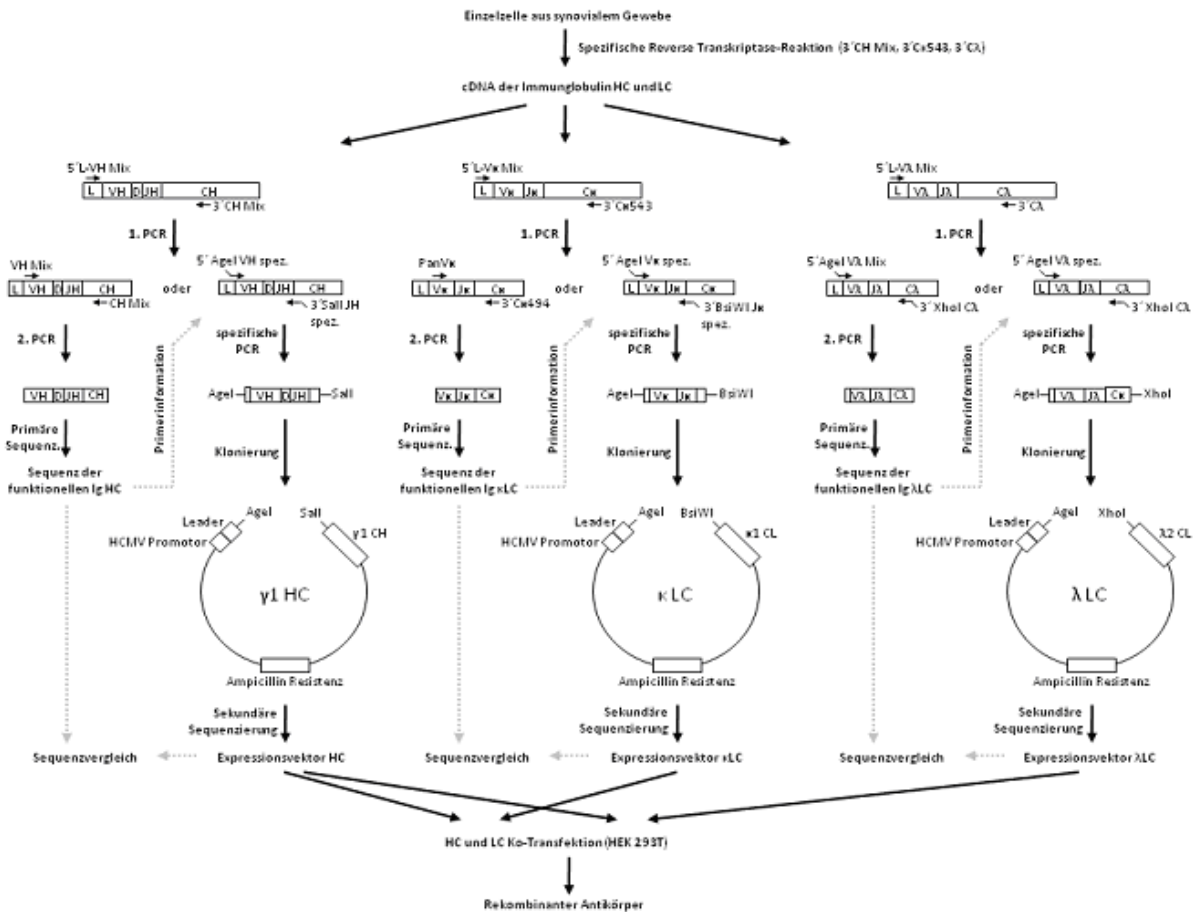


Abb. 24: Strategie zur Amplifikation von Immunglobulin-Genen aus Einzelzellen.

Aus synovialen Gewebe wurden einzelne B-Lymphozyten sortiert (Abschnitt 6.4.2) und cDNA mittels *One- step RT PCR Kit* synthetisiert (Abschnitt 6.4.3). Die so gewonnene cDNA wurde gedritelt und die Immunglobulin-Gene in parallelen Amplifikations-Schritten in zwei aufeinander folgenden PCR Reaktionen vervielfältigt und anschließend sequenziert (primäre Sequenzierung) (Abschnitt 6.4.3 und 6.4.4). Mit Hilfe der so gewonnenen Sequenzinformationen wurde eine weitere spezifische PCR Reaktion aus dem Produkt der 1. PCR Reaktion angesetzt um Restriktionsschnittstellen einzufügen (Abschnitt 6.4.5). Daraufhin wurden die spezifischen PCR-Produkte in Expressionsvektoren kloniert (Abschnitt 6.4.6). Je nachdem ob es sich bei dem PCR-Produkt um eine schwere oder leichte Immunglobulinkette handelt, wurde dabei ein Vektor herangezogen, der entweder den konstanten Bereich der $\gamma 1$ schweren Kette ($\gamma 1$ HC), den konstanten Bereich der $\kappa 1$ leichten Kette (κ LC) oder den konstanten Bereich der $\lambda 2$ leichten Kette (λ LC) besitzt. Klonierte Produkte wurden erneut sequenziert (sekundäre Sequenzierung), um zu überprüfen, ob sich die klonierten Fragmente im richtigen Leseraster befinden und ob sie identisch zu den gewonnenen Sequenzen der primären Sequenzierung sind (Abschnitt 6.4.7). Je ein Paar Vektoren mit klonierter schwerer und leichter Kette wurden daraufhin in HEK 293T Zellen ko-transfiziert und 2x 3 Tage kultiviert (Abschnitt 6.4.8). So gewonnene rekombinante Antikörper wurden aufgereinigt (Abschnitt 6.4.11) und die Konzentration mittels ELISA bestimmt (Abschnitt 6.4.9).

Zur Synthese der Immunglobulin-cDNA wurden die Primer 3' CH Mix für die schwere Kette und 3' C κ 543 und 3' C λ für die leichten Ketten benutzt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: je 1 μ l Primer (je 10 nM), 2 μ l dNTPs (je 400 μ M), 2 μ l Enzyme-Mix, 10 μ l Q-Lösung und 11 μ l H₂O. Pro Vertiefung der 96-well-Platte wurden 30 μ l RT-Ansatz pipettiert (insgesamt 50 μ l Reaktionsansatz). Die 96-well-Platte wurde für 1 h bei 50 °C inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die 5'-Primer der anschließenden PCR in PCR-Reaktionsgefäße vorpipettiert. Dazu wurde in 96 Reaktionsgefäße 1 μ l 5' L-VH Mix vorgelegt. In weiteren 2-mal 96 Reaktionsgefäßen wurde entweder 1 μ l 5' L-V κ Mix oder 1 μ l 5' L-V λ Mix vorpipettiert. Primer-Mixe wurden in einer Konzentration von 10 μ M pro Primer angesetzt. Die PCR Reaktion wurde demzufolge mit einer Konzentration von 200 nM pro Primer durchgeführt. Nach dem Beenden der Reversen Transkriptase-Reaktion wurde die 96-well-Platte kurz bei 500 g (1400 Upm) in einer *Multifuge 1S-R* (Heraeus) abzentrifugiert. Anschließend wurden je 15 μ l der Reverse Transkriptase-Reaktion in eins der vorbereiteten PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Die Reverse Transkriptase-Reaktion wurde somit gedrittelt und jedes Drittel mit einem anderen Primer-Mix versehen. Das PCR-Programm der 1. PCR umfasste folgende Schritte: 15 min 95 °C zur Deaktivierung der Reversen Transkriptase und Aktivierung der Polymerase, gefolgt von 50 Zyklen bestehend aus 95 °C für 30 s, 58 °C (HC und κ LC) bzw. 60 °C (λ LC) für 30 s und 72 °C für 55 s, gefolgt von 72 °C für 10 min.

Reamplifikation (2.PCR) und primäre Sequenzierung

Nach Abschluss der Amplifikation wurde eine Reamplifikation mit dem *AmpliTaQ Gold Kit* (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Reaktion bestand aus 2 μ l MgCl₂ (2 mM), 2,5 μ l 10 x Puffer, 2,5 μ l dNTPs (je 200 μ M), 0,2 μ l AmpliTaQ Gold (1 U) und 2,5 μ l DNA-Amplifikat aus der ersten PCR. Zur Amplifikation der schweren Kette wurden zusätzlich folgende Primer verwendet: 1 μ l VH Mix und 1 μ l CH Mix. Die κ leichte Kette wurde mit 1 μ l 5' Pan V κ und 1 μ l 3' C κ 494 und die λ leichte Kette mit 1 μ l 5' Agel V λ Mix und 1 μ l 3' XhoI C λ reamplifiziert (jeder Primer 10pmol). Primer-Mixe wurden in einer Konzentration von 10 μ M pro Primer angesetzt. In die Reamplifikation wurde demzufolge 400 nM pro Primer eingesetzt. Die Reaktionen wurden jeweils mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 25 μ l aufgefüllt.

Das PCR-Programm umfasste folgende Schritte: 10 min 95 °C zur Aktivierung der Polymerase, 50 Zyklen bestehend aus 95 °C für 30 s, 68 °C (HC), 58 °C (κ LC) bzw. 60 °C (λ LC) für 30 s und 72 °C für 45 s, gefolgt von 10 min 72 °C.

Nach Beendigung der Reamplifikation wurden 18 μ l auf einem 2%igen Agarose-Gel aufgetrennt. Ansätze mit positivem Ergebnis (Banden bei ca. 400 bp) wurden anschließend mit 1 μ l ExoSAP-IT (USB Corporation) versetzt und 15 min auf 37 °C und anschließend 15 min auf 80 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Ansätze mit 80 μ l H₂O verdünnt.

Die direkte Sequenzierung der PCR Produkte wurde wie folgt durchgeführt: 0,5 μ l Primer (500 nM), 2 μ l 5 x Sequenzierungspuffer, 0,8 μ l BigDye Reaktions-Mix und 6,7 μ l DNA aus der Reamplifikation. Die Sequenzierung erfolgte in beide Richtungen. Für die Sequenzierung der schweren Kette in 5'-Richtung wurde der Primer JH total eingesetzt. Nach erfolgter Analyse der Sequenz wurde für die Sequenzierung in 3'-Richtung ein Primer

eingesetzt, der spezifisch für die verwendete V_H-Familie ist (entweder 5' VH2, 5' VH3, 5' VH4, 5' VH4N oder 5' VH6). Die Sequenzierung der leichten Ketten erfolgte analog unter Benutzung des Primer-Mixes J_k Mix (bestehend aus den Primern J_k1/4, J_k2, J_k3 und J_k5) für die Sequenzierung der κ leichten Kette in 5'-Richtung bzw. des Primer-Mixes J_λ Mix (bestehend aus den Primern J_λ1 und J_λ2/3/7) für die Sequenzierung der λ leichten Kette in 5'-Richtung. Die Sequenzierung in 3'-Richtung erfolgte mit dem Primer Pan V_k für die κ leichte Kette bzw. einem der Familien-spezifischen Primer V_λ1, V_λ2, V_λ3a, V_λ3b, V_λ4b oder V_λ7/8 für die λ leichte Kette.

Das PCR-Programm der Sequenzierungs-Reaktion und die Ethanol-Fällung sind unter Abschnitt 6.3.8 beschrieben.

Spezifische PCR

Bei der spezifischen PCR wurden keine Primer-Mixe verwendet, sondern Primer mit Restriktionsschnittstellen, die für die jeweils zu amplifizierende Sequenz spezifisch sind. Die spezifische PCR wurde durchgeführt, um Primer-bedingte Basenaustausche an den 5'- bzw. 3'-Enden der PCR-Fragmente zu minimieren und um Restriktionsschnittstellen für die spätere Klonierung einzufügen. Die Information, welche Primer spezifisch für die jeweilige zu amplifizierende Sequenz war, stammt aus der vorangegangenen Sequenzierungsreaktion. Für die spezifische PCR wurde erneut DNA aus der 1. PCR Reaktion eingesetzt.

Für die Amplifizierung der schweren Kette wurde jeweils ein 5'-Primer (5' Agel VH1, 5' Agel VH1/5, 5' Agel VH1-18, 5' Agel VH1-24, 5' Agel VH3, 5' Agel VH3-9, 5' Agel VH3-23, 5' Agel VH3-33, 5' Agel VH4, 5' Agel VH4-34, 5' Agel VH4-39 oder 5' Agel VH6-1) mit einem 3'-Primer (3' Sall JH 1/2/4/5, 3' Sall JH 3 oder 3' Sall JH 6) gepaart. Für die Amplifikation der leichten Kette wurde der 5'-Primer 5' Agel V_k 1-5, 5' Agel V_k 1-9, 5' Agel V_k 1D-43, 5' Agel V_k 2-24, 5' Agel V_k 2-28, 5' Agel V_k 2-30, 5' Agel V_k 3-11, 5' Agel V_k 3-15, 5' Agel V_k 3-20 oder 5' Agel V_k 4-1 bzw. 5' Agel V_λ 1, 5' Agel V_λ 2, 5' Agel V_λ 3, 5' Agel V_λ 4/5, 5' Agel V_λ 6 oder 5' Agel V_λ 7/8 mit den 3'-Primern 3' BsiWI J_k1/4, 3' BsiWI J_k 2, 3' BsiWI J_k 3 oder 3' BsiWI J_k 5 bzw. dem Primer 3' XhoI C_λ gepaart. Jeder Primer wurde in einer Konzentration von 10 μM angesetzt.

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 2 x 1 μl Primer (400 nM), 2 μl MgCl₂ (2 mM) 2,5 μl 10 x Puffer, 2,5 μl dNTPs (je 200 μM), 0,2 μl AmpliTaq Gold (1 U) und 2,5 μl DNA-Amplifikat aus der 1. PCR Reaktion. Das PCR-Programm umfasste folgende Schritte: 10 min 95°C zur Aktivierung der Polymerase, 45 Zyklen bestehend aus 95 °C für 30 s, 58 °C (HC und κLC) bzw. 60 °C (λLC) für 30 s und 72 °C für 45 s, gefolgt von 10 min 72 °C.

Anschließend wurden 5 μl des PCR Ansatzes auf einem 2%igen Agarose-Gel aufgetragen. Positive Ansätze wurden mittels dem *Nucleospin Extract II Kit* (Macherey-Nagel) aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die DNA wurde in 25 μl Elutionspuffer eluiert.

Klonierung in Expressionsvektoren

Für den Restriktionsverdau der PCR-Produkte der schweren Kette wurden zu 25 µl aufgereinigtem PCR-Produkt 3 µl Restriktionspuffer und je 0,5 µl Restriktionsenzym AgeI (Fermentas) und SalI (Fermentas) gegeben. Die λ leichte Kette wurde mit je 0,5 µl AgeI und XhoI (Fermentas) verdaut. Die Ansätze wurden 2 h bei 37 °C inkubiert. Der Verdau der κ leichten Kette erfolgte sequenziell mit einem ersten Verdauungsschritt von 2 h mit 0,5 µl AgeI bei 37 °C, gefolgt von einem weiteren Verdauungsschritt mit dem Restriktionsenzym BsiWI (New England Biolabs). Dazu wurden zu den Proben ohne weitere Aufreinigung 3,5 µl NEB3 Puffer und 0,5 µl BsiWI pipettiert und weitere 2 h bei 55 °C inkubiert. Nach Beendigung des Restriktionsverdaus wurden die Proben erneut mit dem *Nucleospin Extract II Kit* aufgereinigt.

Die Expressionsvektoren wurden analog dazu geschnitten. Der Ansatz setzte sich zusammen aus 10 µl Expressionsvektoren, 5 µl Restriktionspuffer, je 1 µl Restriktionsenzym und 33 µl H₂O. Auch hier erfolgte der Verdau des κ LC-Vektors sequenziell. Nach erfolgtem Restriktionsverdau wurden die Vektoren ebenfalls mit dem *Nucleospin Extract II Kit* aufgereinigt.

Die Ligation erfolgte mit Hilfe der T4-Ligase (Fermentas). Dazu wurden 2 µl verdauter Vektor (ca. 100 ng), 4 µl verdautes PCR-Produkt (ca. 20-35 ng), 1 µl T4-Puffer, 0,5 µl T4-Ligase (0,5 U) und 2,5 µl H₂O zusammenpipettiert und über Nacht bei 16 °C inkubiert.

Die Transformation der Vektoren erfolgte in E.coli des Stammes DH10B, die ursprünglich von der Firma Clontech bezogen wurden. Die hier verwendeten Bakterien wurden mit folgendem Protokoll hergestellt: Eine einzelne Kolonie wurde über Nacht in 2 ml YT-Medium ohne Ampicillin bei 200 Upm und 37 °C geschüttelt. Mit der Übernacht-Kultur wurden weitere 500 ml YT-Medium angeimpft und bei 200 Upm und 37 °C geschüttelt. Nach ca. 3,5h erreichten sie eine optische Dichte bei 600 nm von 0,5 bis 0,8. Die Bakterien wurden zu jeweils 250 ml in Zentrifugationsröhrchen überführt, 30 min auf Eis gestellt und anschließend in einer Zentrifuge (Firma) 10 min bei 3000 Upm bei 4 °C abzentrifugiert. Die Bakterien wurden daraufhin in 83 ml (1/3 Originalvolumen) sterile 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 3000Upm bei 4 °C wurden die Bakterien in eiskaltem 2,5 ml 0,1 M CaCl₂ + 15% Glycerin-Lösung (1/100 Originalvolumen) resuspendiert und zu je 100 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden sofort mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

Für die Transformation wurden pro Ansatz 10 µl kompetente Zellen mit 2 µl ligiertem Vektor versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschritt von 42 °C für 45 s im Heizblock durchgeführt. Die Bakterien wurden 2 min auf Eis abgekühlt und mit 50 µl SOC-Medium (Invitrogen) versetzt und anschließend für 60 min bei 37 °C und 200 Upm geschüttelt. Das Ausplattieren erfolgte auf YT-Agar (YT Broth (Bio 101), 15% Agar Select (Sigma), 50 µg/ml Ampicillin (Sigma)). Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Screening-PCR, Plasmid-Präparation und sekundäre Sequenzierung

Bei einer *Screening*-PCR wurden transformierte Vektoren auf klonierte Fragmente unter Verwendung der PCR-Technik überprüft. Dazu wurde eine Bakterienkolonie mit einer Pipettenspitze auf eine Replikaplatte

übertragen (Inkubation über Nacht bei 37 °C) und anschließend in 20 µl H₂O überführt. Daraufhin wurden 20 µl PCR-Reaktionsmix dazugegeben (40 µl Gesamtvolumen). Die PCR Reaktion wurde mit dem *DreamTaq Kit* (Fermentas) durchgeführt. Der Mix setzte sich wie folgt zusammen: 1 µl 5'-Primer (VH Mix für die schwere Kette, Vκ Mix für die κ leichte Kette und Vλ Mix für die λ leichte Kette), 1 µl 3'-Primer (3'γ-HC für die schwere Kette, Cκ110 für die κ leichte Kette bzw. 3' Cλ für die λ leichte Kette), 4 µl PCR-Puffer, 3,2 µl MgCl₂ (2 mM), 3 µl dNTPs (je 200 µM), 0,1 µl DreamTaq-Polymerase (0,5 U) und 8,1 µl H₂O. Primer-Mixe wurden in einer Konzentration von 10 µM pro Primer angesetzt. Somit wurden für die *Screening*-PCR 400 nM pro Primer eingesetzt.

Das PCR Programm umfasste folgende Schritte: 95 °C für 10 min um die Bakterien zu lysieren und die DNA zu schmelzen, anschließend 40 Zyklen aus je 95 °C für 30 s, 68 °C für 30 s und 72 °C für 45 s, gefolgt von einem terminalen Elongationsschritt von 72 °C für 10 min. Die Amplifikation wurde in einem *T personal Thermocycler* (Biometra) durchgeführt.

Die Ansätze wurden auf einem 2%igen Agarosegel aufgetragen. Positive Proben (Bande bei ca. 450 bp) wurden am nächsten Tag von der Replikaplatte in 5ml flüssiger Nährlösung (YT Broth (Bio 101), 50 µg/ml Ampicillin (Sigma)) übertragen und mind. 20 h bei 37 °C und 200 UpM geschüttelt.

Die Plasmid-DNA der 5 ml-Übernachtskulturen wurde unter Verwendung des *NucleoSpin Plasmid Kits* (Macherey-Nagel) isoliert. Die Isolierung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die DNA wurde in 3 x 25 µl H₂O eluiert, um eine möglichst hohe Ausbeute zu erreichen. Die Bestimmung der Konzentration der Plasmid-DNA erfolgte auf einem *NanoDrop ND-1000 Photometer* (Thermo Scientific). Für die anschließende Transfektion von HEK 293T Zellen wurden mindestens 10 µg pro Plasmid benötigt. Von Plasmiden mit geringerer Ausbeute wurden erneut Bakterien von der Replikaplatte in eine Übernachtskultur übertragen und anschließend die Plasmid-Präparation wiederholt.

Zusätzlich wurden alle Plasmide erneut sequenziert (sekundäre Sequenzierung). Die Sequenzierungs-Reaktion und die anschließende Ethanol-Fällung wurden im Abschnitt 6.3.8 beschrieben. Für die Sequenzierung des γ1 HC-Vektors wurde der Primer 3'γ-HC verwendet. Die Sequenzierung der Vektoren für die leichten Ketten erfolgte mit dem Primer Cκ110 (κ LC) bzw. 3' Cλ (λ LC). Die ermittelten Sequenzen wurden mit denen der primären Sequenzierung verglichen, um zu überprüfen, ob sie identisch sind und ob sich die klonierten Fragmente im richtigen Leseraster befinden.

Transfektion von HEK 293T Zellen

HEK 293T Zellen wurden in Ø 145 mm Zellkulturschalen (Greiner) bei 37 °C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert. Die Zellen wurden in 25 ml DMEM (Invitrogen) + 10% FCS (PAN), 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) kultiviert. Für die Transfektion wurden zu 70-80% konfluente Zellen benutzt. Direkt vor der Transfektion wurden die Zellen gewaschen und für die Transfektion und Antikörper-Produktion in 25 ml DMEM + 1% Nutridoma SP (Roche) kultiviert. Als Transfektionsreagenz wurde Polyethylenimin (Sigma) benutzt.

Der Transfektionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: Pro 10 µg Plasmid-DNA wurden 500 µl 150 mM NaCl-Lösung vorpipettiert (Abzüglich des Volumens von 10 µg Plasmid-DNA). Dazu wurden je 10 µg γ1 HC-Plasmid-

DNA und entweder 10 µg κ LC-Plasmid-DNA oder 10 µg λ LC-Plasmid-DNA gegeben, so dass das Gesamtvolumen des Ansatzes 1000 µl ergibt. Daraufhin wurde der Ansatz mit 60 µg Polyethylenimin (Verhältnis DNA / Polyethylenimin: 1 / 3; entspricht 20 µg Plasmid-DNA / 60 µg Polyethylenimin) versetzt, sofort für mind. 10 s gevortext und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde die Transfektions-Lösung gleichmäßig auf die vorbereitete Zellkulturschale gegeben und gut verteilt. Nach Inkubation bei 37 °C für 3 bis 4 Tage wurde der Zellkultur-Überstand mit den sezernierten Antikörpern abgenommen und bei 4 °C aufbewahrt. Die HEK 293T Zellen wurden erneut mit 25 ml DMEM + 1% Nutridoma kultiviert. Nach 3 bis 4 Tagen wurde der Überstand erneut abgenommen und mit dem Überstand der ersten Kultivierungs-Periode vereint.

Bestimmung der Konzentration und Spezifität rekombinanter Antikörper durch *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Für die Bestimmung der Konzentration der rekombinanten Antikörper wurden ELISA-Platten (Costar) mit 50 µl/Vertiefung anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch) (1/500 in PBS verdünnt) gekoppelt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die beschichteten Platten wurden 3-mal mit Millipore-Wasser gewaschen und anschließend für 2 h mit 200 µl/Vertiefung ELISA-Puffer (PBS, 2 mM EDTA, 0,05% Tween-20) blockiert.

Für die erste Konzentrationsbestimmung wurden die Antikörper 1/6 vorverdünnt und anschließend in 7 weiteren Verdünnungsstufen 1/3 verdünnt. Als Standard wurde human IgG1 (Sigma) verwendet (1,2 mg/ml) und auf 5 µg/ml vorverdünnt und ebenfalls in 1/3-Schritten weiterverdünnt. Für die zweite Konzentrationsbestimmung wurden alle rekombinanten Antikörper und der Standard auf eine Konzentration von 1 µg/ml eingestellt und anschließend in 1/2-Verdünnungsschritten weiterverdünnt.

Nach dem Blockieren wurden die ELISA-Platten erneut 3-mal mit Millipore-Wasser gewaschen und 50 µl Antikörperverdünnung pro Vertiefung zugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten erneut 3mal gewaschen und 50 µl Detektionsantikörper pro Vertiefung für 1,5 h dazugegeben. Als Detektionsantikörper diente ein mit HRP gekoppelter goat anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch), der 1/1000 in ELISA-Puffer verdünnt wurde. Der anschließende Waschschrift setzte sich zusammen aus 3-mal Waschen mit Millipore-Wasser, 1-mal Waschen mit ELISA-Puffer und erneut 3-mal Waschen mit Millipore-Wasser. Daraufhin wurden 100 µl Substrat (BioRad) hinzugegeben und nach 10 min bzw. 20 min Inkubation bei Raumtemperatur die Absorption bei 405 nm in einem *SpecextraMax 190*-Photometer (Molecular Devices) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software *Softmax Pro* (Molecular Devices).

Für die Bestimmung der Polyreaktivität wurden die drei Ag Insulin, LPS und dsDNA über Nacht in einer Konzentration von 1 µg/ml an ELISA-Platten gekoppelt. Die Messung erfolgte ohne BSA-Block in vier Verdünnungen (1 µg/ml, 0,25 µg/ml, 62,5 ng/ml und 15,6 ng/ml).

Für die Bestimmung der Autoreaktivität wurden die Platten über Nacht mit den Ag in einer Konzentration von 1 µg/ml (Kollagen Typ II, BSA) bzw. 5×10^7 Bakterien beschichtet. Zum Blockieren wurde PBS/2% BSA verwendet. Die Antikörper wurden auf eine Konzentration von 1 µg/ml verdünnt und für 2 h inkubiert. Die Detektion erfolgte analog zur Konzentrationsbestimmung. Alle Ag wurden mindestens 2-mal unabhängig gemessen. Als

Grenze für Reaktivität wurde eine OD_{405} von 0,5 herangezogen. Der Test für Reaktivität gegen die Auto-Ag RF, MCV und Vimentin wurde freundlicherweise von der Firma Orgentec zur Verfügung gestellt. Der ELISA-Test erfolgt mit Hilfe des mitgelieferten Protokolls.

Ermittlung der Autoreaktivität durch *Immunoplotting* an Leberzellextrakten

Die Messung der Polyreaktivität erfolgte anhand von Leberzelllysaten. Dazu wurden 200 µg der Lysate in einer *MiniProtean II*-Laufkammer (BioRad) auf ein 10%iges, nicht reduzierendes SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) aufgetragen und anschließend in einer *Mini Trans Blot*-Kammer (BioRad) auf eine Nitrozellulose-Membran (Schleicher&Schuell) in Tris/Glycin-Puffer (48mM Tris, 110mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) transferiert. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 100 V. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit TBS/0,4% Tween20-Puffer geblockt. Daraufhin wurde die Membran für 1h mit den rekombinanten Antikörpern inkubiert und anschließend 2-mal mit 5%iger Milchpulverlösung in PBS und 1-mal mit PBS gewaschen.

Das Messen der Reaktivität erfolgte mit Hilfe des Program *Image Tools* (<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>). Von den ermittelten Werten wurden die Werte der PBS-Kontrolle abgezogen. Als polyreaktiv wurden Antikörper gewertet, die eine Bindungskapazität von mehr als 1000 Einheiten besitzen.

Aufreinigung rekombinanter Antikörper mittels ProteinG und Konzentrationsbestimmung

Die rekombinanten Antikörper wurden mit Hilfe von ProteinG-Kügelchen (GE healthcare) aufgereinigt. Dazu wurden pro 50ml Zellkultur-Überstand 50 µl ProteinG-Kügelchen in PBS gewaschen und bei 2000 Upm für 10 min in einer *Multifuge 1S-R* (Heraeus) abzentrifugiert und in 50µl PBS pro Ansatz resuspendiert. Anschließend wurde die entsprechende Menge ProteinG-Kügelchen in jeden Ansatz pipettiert und über Nacht bei 4 °C in einem *Rotator STR4*-Rotor (Stuart) gedreht.

Nach der Inkubation der Überstände mit ProteinG-Kügelchen wurde der Ansatz bei 2000 Upm für 10 min in einer *Multifuge 1S-R* (Heraeus) abzentrifugiert und die Kügelchen auf equilibrierte *BioSpin-Säulchen* (BioRad) gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit 1ml PBS wurden die Antikörper 2-mal mit 200 µl 0,1 M Glycin-Puffer pH 3,0 eluiert. Die Elution erfolgte in 1,5 ml Reaktionsgefäße, die mit 20 µl 1M Tris pH 8,0 + 0,01% NaN_3 gefüllt waren, um den sauren pH-Wert des Glycin-Puffers zu neutralisieren.

Die Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten Antikörper erfolgte an einem *NanoDrop ND-1000 Photometer* (Thermo Scientific). Als Konzentration wurde das arithmetische Mittel aus drei unabhängigen Messungen berechnet.

Ermittlung autoreaktiver Antikörper durch HEp2-Zellen

Für die Ermittlung autoreaktiver Antikörper wurden mit HEp2-Zellen beschichtete Objektträger (Bios Labordiagnostik) benutzt. Die Antikörper wurden in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt. Pro Antikörper wurden 70 µl in PBS/0,1% BSA angesetzt.

Die HEp2-Objektträger wurden mit 70µl PBS/3% BSA blockiert. Anschließend wurden die verdünnten rekombinanten Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und daraufhin gründlich in PBS/0,1% BSA gewaschen. Die Detektion der rekombinanten Antikörper erfolgte mit Cy3-gekoppeltem Ziege anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch) in einer Verdünnung von 1/500 in PBS/0,1% BSA. Die Inkubation des Detektionsantikörpers erfolgte ebenfalls für 1h in einer feuchten Kammer. Nach Waschen in PBS/0,1% BSA wurden die HEp2-Objektträger in 100 µl FluoromountG eingedeckelt und bei 4 °C aufbewahrt. Das Aufnehmen der Bilder erfolgte mittels einer *SPOT RT Kamera* (Diagnostic Instruments) an einem *Axiophot* Mikroskop (Zeiss).

Ermittlung der Affinität rekombinanter Antikörper durch *Surface Plasmon Resonanz* Analyse

Die Stärke der Wechselwirkung zwischen Antikörpern und ihren Ag wurde mit Hilfe des BIAcore 2000 *surface plasmon Resonanz*-basierenden Systems bestimmt. Alle Lösungen wurden durch einen 0,22 µm-Filter gereinigt und anschließend unter Vakuum entgast. Als Lauf- und Verdünnungspuffer für die Proben wurde ein HBS-EP-Puffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl₂, 3 mM EDTA, 0,005% v/v Tween20, pH 7,4) verwendet. Aufgereinigte Antikörper wurden mit Hilfe des amino-coupling Kits (Biacore) auf einem *research grade CM5 sensor chip* immobilisiert (Kopplungskonzentration: 40-60 µg/ml in Malat pH 4). Die Immobilisierung der Antikörper veränderte den Nullwert des Sensograms auf ca. 14000 Einheiten. Die Kontrollzelle (fc1) wurde präpariert, indem die carboxylierte Dextranmatrix des *Sensor Chips* aktiviert und anschließend ohne die Zugabe von Antikörpern wieder inaktiviert wurde. Für die initialen Messungen wurden 3 µM MCV, Vimentin und IVIg bzw. 10 µM Insulin zu den immobilisierten Antikörpern gegeben. Für die Messung der kinetischen Konstanten des MCV-spezifischen Antikörpers B0117 PC07 wurde MCV in neun Verdünnungsstufen eingesetzt (4,2 nM bis 1000 nM). Um den Einfluss von Massentransport und Probenverteilung zu minimieren, wurde die Messung unter zwei verschiedenen Bedingungen durchgeführt (Assoziation für 5 min bei einer Flussrate von 10 µl/min und Assoziation für 8 min bei einer Flussrate von 30 µl/min). Zwischen den Messungen wurde der Sensor Chip mit 3 M Harnstoff für 5min regeneriert. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt.

Für die Analyse der Daten wurde die BIAevaluation software benutzt. Die aufgenommenen Werte der Kontrollzelle wurden von denen der Antikörper-beladenen Zellen subtrahiert. Die Berechnung der Gleichgewichtskonstanten der Assoziation (K_A) und Dissoziation (K_D) sowie der Affinität erfolgte mit Hilfe kinetischer Modelle, die in der Software inbegriffen sind.

Anhang

IgH-Lokus

Der IgH-Locus des Menschen umfasst etwa 1,25Mb und sitzt auf der Bande 14q32.33 am telomeren Ende des langen Arms von Chromosom 14 [165,166,167]. Abhängig vom Haplotyp besitzt der menschliche IgH-Locus 170 bis 176 Gensegmente (206 bis 212, wenn man die Segmente außerhalb des Haupt-IgH-Locus mit einbezieht). Von den 123 bis 129 IgHV-Gensegmenten sind nur 38 bis 46 funktionell (Abb.25 und Tab.17). Sie werden je nach Haplotyp zu 6 oder 7 VH-Familien zusammengefasst [168]. Die 85 Pseudogene (meist Leserasterverschiebungen und verkürzte Gensegmente) gruppieren sich größtenteils ebenso in die 7 VH-Familien [168,169,170,171,172,173,174]. Neben den IgHV-Segmenten besitzt der Locus 27 IgD-Gensegmente, von denen 23 funktionell sind (7 D-Familien) [175,176,177,178,179], 9 IgHJ-Gensegmente, wobei 3 Segmente Pseudogene bilden [179,180] und in den meisten Haplotypen 11 IgHC-Gensegmente, von denen meist 9 funktionell sind [181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192]. Für den IgHC-Locus wurden in gesunden Individuen ebenfalls diverse Haplotypen (multigene Deletionen, Duplikationen oder sogar Triplikationen) beschrieben. Dies führt dazu, dass die Anzahl von IgHC-Gensegmenten zwischen 5 und 19 variiert.

Die Nomenklatur der IgHV-Gensegmente besteht aus der Nummer der VH-Familie, gefolgt von einem Bindestrich und einer Nummer für die Lokalisation des Gensegments im Locus von 3' zu 5' (z.B.: IGHV1-2, IGHV 3-23, IGHV4-59). Daneben gibt es 7 Gensegmente, die als Insertions-Polymorphismus beschrieben wurden und noch nicht präzise lokalisiert wurden. Diese Gene sind benannt nach der Nummer ihrer VH-Familie, einem Bindestrich und einem kleinen Buchstaben (z.B.: u.a. IGVH5-a, IGVH4-b, IGVH1-e). Das mögliche Gen IGHV7-77 wurde in neusten Untersuchungen nicht mehr gefunden [173] und erscheint ebenfalls nicht im potentiellen Repertoire. Allelische Polymorphismen, deren Lokalisation bekannt sind, werden durch einen zusätzlichen Bindestrich, gefolgt von einer weiteren Zahl beschrieben (z.B.: IGHV7-4-1 oder die 5 Gene in einer 50kb Insertion, die man in rund 45% der Kaukasier findet: IGHV3-30-5, IGHV4-30-4, IGHV3-30-3, IGHV4-30-2 und IGHV4-30-1). Die Sequenz der polymorphen Segmente IGHV3-30-5 und 4-30-1 ist identisch zu den Segmenten IGHV3-30 bzw. IGHV4-31.

Tab. 17: IgHV-Repertoire.

IGHV-Familie	Anzahl funktioneller Gene [174]	Verwendung [134]
VH1	9	13,1%
VH2	3	1,9%
VH3	18-20*(+1**)	53,9%
VH4	6-9*(+1**)	24,8%
VH5	1	2,9%
VH6	1	2,4%
VH7	0-1*	1,0%
Total	38-44*(+2**)	

*Allelische Polymorphismen durch Insertion/Deletion; **Gene mit Allelen unterschiedlicher Funktionalität (IGHV3-11 und IGHV4-61)

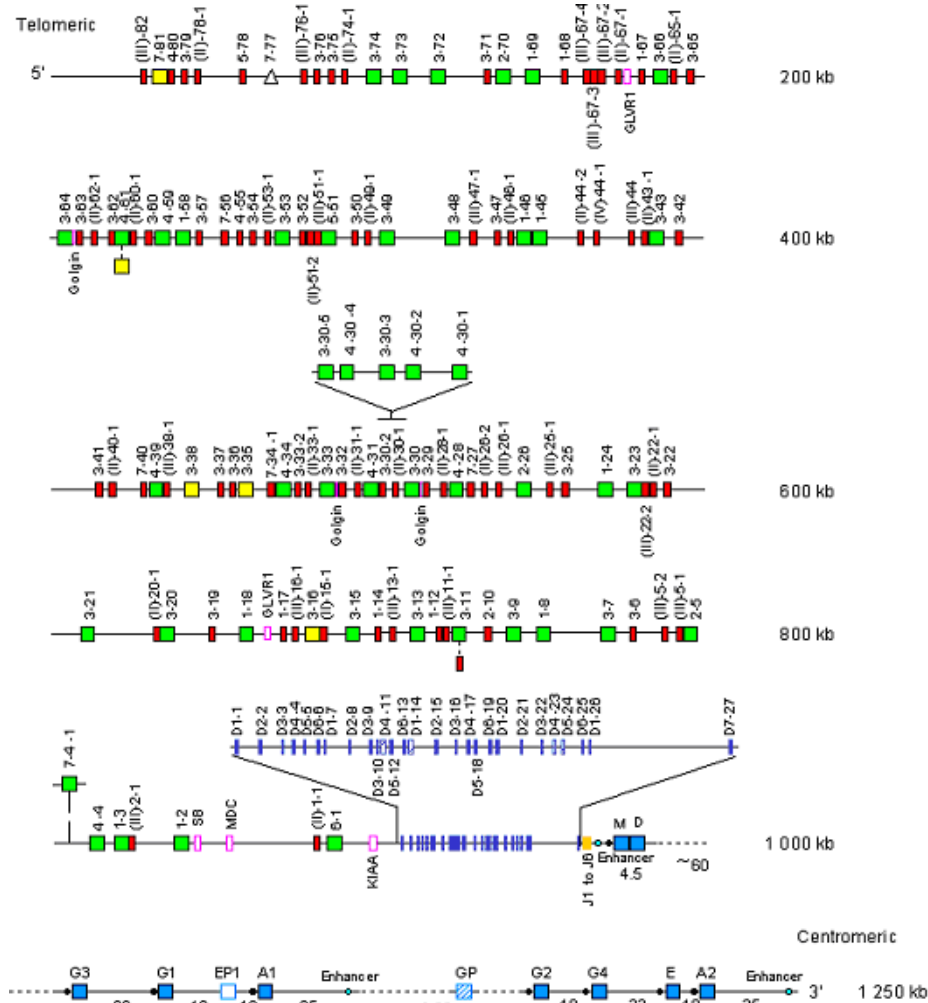


Abb. 25: Der IgH-Locus des Menschen.

Der IgH-Locus besteht aus 176 Gensegmenten und umfasst 1,25Mb auf Chromosom 14. Funktionelle VH- Segmente sind grün dargestellt, rot dargestellte VH-Segmente sind Pseudogene, gelbe Segmente besitzen einen funktionalen Leserahmen, werden aber nicht exprimiert. Das weiße Dreieck markiert ein Gen, dass in jüngsten Untersuchungen nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Pink umrandete Boxen stellen funktionelle Gene dar, die keine Ig-Gensegmente sind. D-Segmente sind violett dargestellt, D-Pseudogene violett umrandet. Gelb Streifen markieren die 6 JH-Gensegmente und blaue Boxen markieren die konstanten Bereiche der schweren Ig-Kette. [193]

Igk-Lokus

Der humane Igk Locus befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 (2p11.1) [194]. Der Locus ist 1820kb lang und besitzt 76 IgkV-Gensegmente, die sich in 7 Familien gliedern [168,195,196,197,198,199], 5 IgkI Gensegmente [168,199,200] und ein IgkC Gensegment [201]. Die 76 IgkV- Gensegmente sind in zwei Cluster angeordnet, die 800kb voneinander getrennt sind (Abb.26). Der distale Cluster (am centromeren 5'-Ende des Locus gelegen) umspannt 400kb und beinhaltet 36 IgkV-Gensegmente. Der proximale Cluster (am telomeren 3'-Ende des Locus) besitzt eine Länge von 600kb und 40 Gensegmente.

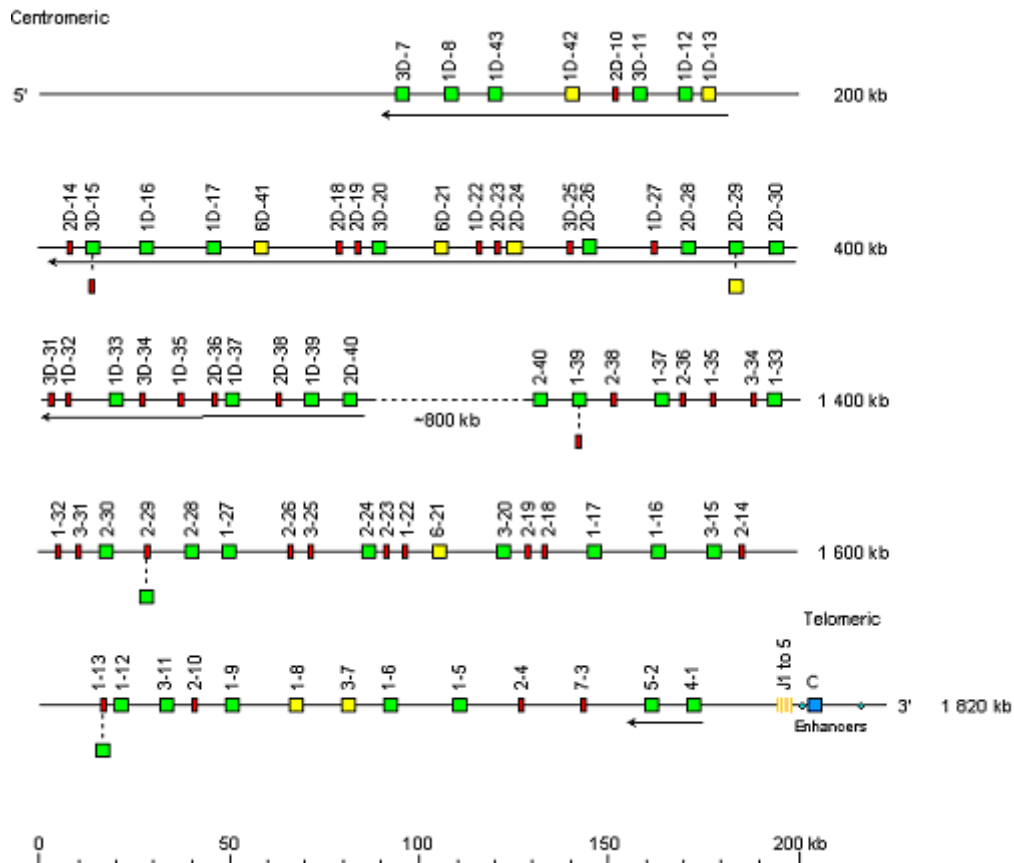


Abb. 26: Der Igk-Locus des Menschen.

Der Igk-Locus umfasst 1,8Mb auf Chromosom 2. Funktionelle Vκ-Segmente sind grün dargestellt, rot dargestellte Segmente sind Pseudogene, gelbe Segmente besitzen einen funktionalen Leserahmen, werden aber nicht exprimiert. Jκ-Gensegmente sind gelb markiert, die κ-konstante Kette ist blau dargestellt. [193]

Der Locus besitzt 31 bis 36 funktionelle IgkV-Gensegmente, die sich in 5 Familien gruppieren (Tab.18). Alle 5 IgkJ-Gensegmente sind funktionell, ebenso das eine IgkC-Genfragment. Ein seltener Haplotyp wurde beschrieben, der nur den proximalen IgkV-Gencluster besitzt und somit nur 17 bis 20 funktionelle IgkV-Gensegmente besitzt [202,203].

Tab. 18: IgkV-Repertoire.

IgkV-Familie	Anzahl funktioneller Gene [199]	Verwendung [135]
Vk1	15(+2*)	42,7%
Vk2	7(+2*)	11,3%
Vk3	6(+1*)	36,6%
Vk4	1	8,2%
Vk5	1	0,8%
Total	30(+5*)	

*Gene mit Allelen unterschiedlicher Funktionalität (IgkV1-13, IgkV2-29, IgkV1-39, IgkV2D-29, IgkV3D-15)

Die Benennung der IgkV-Gensegmente besteht aus einer Nummer für die Familie, gefolgt von einem Bindestrich und einer Nummer, die für die Lokalisation des Gensegments vom 3' zum 5'-Bereich des Locus steht (z.B.: IGKV1-5, IGKV2-14). Die IgkV-Gensegmente des duplizierten distalen κV-Clusters besitzen die gleichen Nummern, wie die korrespondierenden Gene des proximalen Vκ-Genclusters. Zusätzlich wird der Buchstabe D angehängt (z.B.: IGKV1D-8, IGKV2D-10) [204].

Igλ-Lokus

Die Igλ-Lokus des Menschen sitzt auf dem kurzen Arm von Chromosom 22 (22q11.2) und umspannt 1050kb [205]. Er besitzt 73 bis 74 IgλV Gensegmente auf 900kb und abhängig vom Haplotyp 7 bis 11 IgλJ Gensegmente und ebenso 7 bis 11 IgλC Gensegmente (Abb.27 und Tab.19) [168,206,207,208,209,210]. Hinter jedem IgλJ-Gensegment folgt ein IgλH-Gensegment [211,212,213]. Der Igλ-Lokus besitzt 29 bis 33 funktionelle IgλV-Gensegmente, die sich zu 10 Familien sortieren. Dazu kommen je nach Haplotyp 4-5 funktionelle IgλJ- und 4-5 funktionelle IgλC-Gensegmente [212,214,215,216].

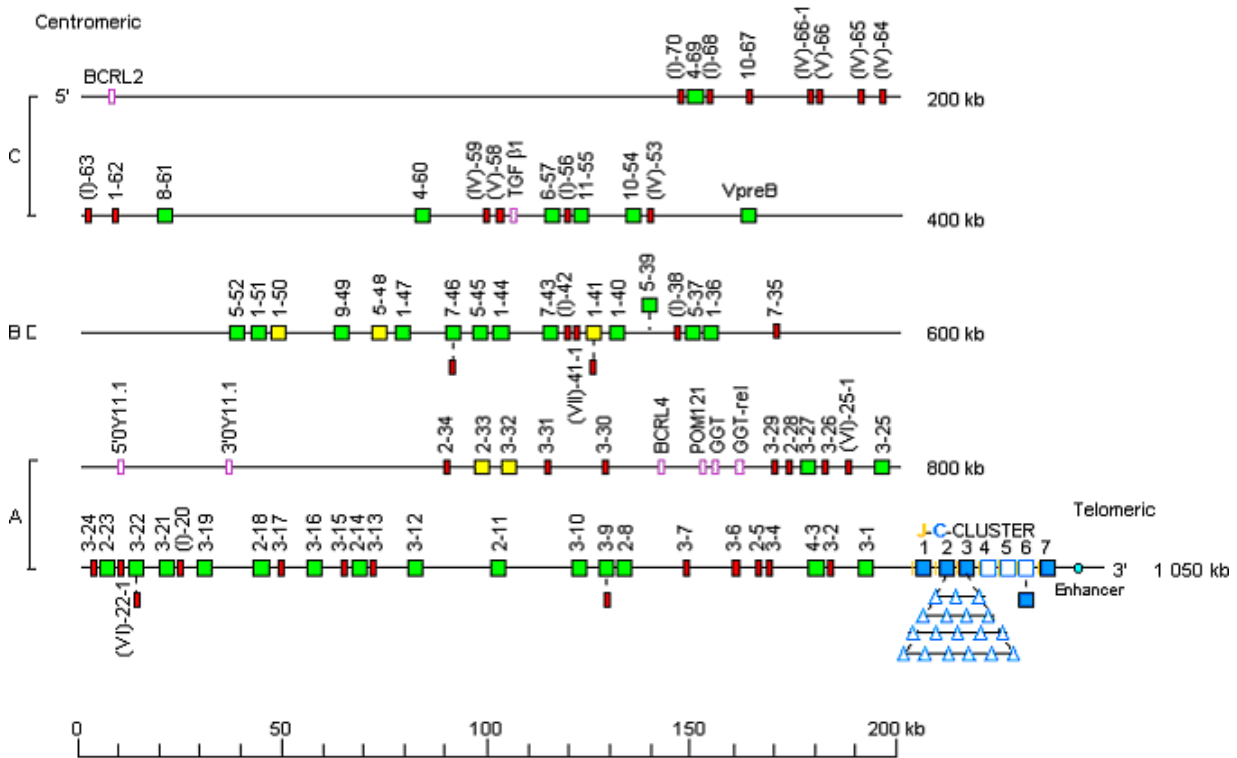


Abb. 27: Der Igλ-Lokus des Menschen.

Der Igλ-Lokus umfasst 1,05Mb auf Chromosom 22. Funktionelle Vλ-Segmente sind grün dargestellt, rot dargestellte Segmente sind Pseudogene, gelbe Segmente besitzen einen funktionalen Leseraster, werden aber nicht exprimiert. Pink umrandete Boxen stehen für Nicht-Immunglobulin-Gene, die zwischen den λ-Gensegmenten sitzen. Jλ-Gensegmente sind gelb markiert und sitzen vor den dunkelblau markierten Cλ-Segmenten. Weiß dargestellte Cλ-Segmente sind Pseudogene. Weiß dargestellte Dreiecke weisen auf variable Duplikationen der Cλ2 und Cλ3-Segmente hin. [193]

Tab. 19: IgV λ -Repertoire.

IG λ V-Familie	Anzahl funktioneller Gene [206]	Verwendung [217]
V λ 1	5	29,1%
V λ 2	5	33,1%
V λ 3	8(+2*)	15,7%
V λ 4	3	5,8%
V λ 5	3-4**	3,5%
V λ 6	1	3,5%
V λ 7	1(+1*)	4,1%
V λ 8	1	1,2%
V λ 9	1	0,6%
V λ 10	1	3,5%
Total	29-30(+3*)	

*Gene mit Allelen unterschiedlicher Funktionalität (Ig λ V3-09, Ig λ V3-22, Ig λ V7-46); **Allelische Polymorphismen durch Insertion/Deletion (Ig λ V5-39)

Die Nomenklatur der Ig λ V-Gensegmente ist analog zu den der anderen Loci und besteht aus einer Zahl für die V λ -Familie, gefolgt von einem Bindestrich und einer Zahl, die die Lokalisation des Gensegments vom 3' - zum 5'-Ende des Ig λ -Lokus beschreibt [218]. Allelische Insertions/Deletions-Polymorphismen betreffen nur das Gensegment IGLV5-39.

Referenzen

- [1] Berek, C. und Milstein, C. (1988): The dynamic nature of the antibody repertoire, *Immunol Rev* 105.
- [2] Tonegawa, S. (1983): Somatic generation of antibody diversity, *Nature* 302 [5909].
- [3] Weigert, M.; Gatmaitan, L.; Loh, E.; Schilling, J. und Hood, L. (1978): Rearrangement of genetic information may produce immunoglobulin diversity, *Nature* 276 [5690].
- [4] Early, P.; Huang, H.; Davis, M.; Calame, K. und Hood, L. (1980): An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH, *Cell* 19 [4].
- [5] Janeway, C. Editor (2009): *Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- [6] Rolink, A. und Melchers, F. (1993): Generation and regeneration of cells of the B-lymphocyte lineage, *Curr Opin Immunol* 5 [2].
- [7] Melchers, F.; Rolink, A.; Grawunder, U.; Winkler, T. H.; Karasuyama, H.; Ghia, P. und Andersson, J. (1995): Positive and negative selection events during B lymphopoiesis, *Curr Opin Immunol* 7 [2].
- [8] Rolink, A. G.; Schaniel, C.; Andersson, J. und Melchers, F. (2001): Selection events operating at various stages in B cell development, *Curr Opin Immunol* 13 [2].
- [9] Nemazee, D. (2000): Receptor selection in B and T lymphocytes, *Annu Rev Immunol* 18.
- [10] Wardemann, H.; Yurasov, S.; Schaefer, A.; Young, J. W.; Meffre, E. und Nussenzweig, M. C. (2003): Predominant autoantibody production by early human B cell precursors, *Science* 301 [5638].
- [11] Alt, F. W.; Oltz, E. M.; Young, F.; Gorman, J.; Taccioli, G. und Chen, J. (1992): VDJ recombination, *Immunol Today* 13 [8].
- [12] Hess, J.; Werner, A.; Wirth, T.; Melchers, F.; Jack, H. M. und Winkler, T. H. (2001): Induction of pre-B cell proliferation after de novo synthesis of the pre-B cell receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 [4].
- [13] ten Boekel, E.; Melchers, F. und Rolink, A. (1995): The status of Ig loci rearrangements in single cells from different stages of B cell development, *Int Immunol* 7 [6].
- [14] Hieter, P. A.; Korsmeyer, S. J.; Waldmann, T. A. und Leder, P. (1981): Human immunoglobulin kappa light-chain genes are deleted or rearranged in lambda-producing B cells, *Nature* 290 [5805].
- [15] Korsmeyer, S. J.; Hieter, P. A.; Sharrow, S. O.; Goldman, C. K.; Leder, P. und Waldmann, T. A. (1982): Normal human B cells display ordered light chain gene rearrangements and deletions, *J Exp Med* 156 [4].
- [16] Rolink, A.; Grawunder, U.; Haasner, D.; Strasser, A. und Melchers, F. (1993): Immature surface Ig+ B cells can continue to rearrange kappa and lambda L chain gene loci, *J Exp Med* 178 [4].
- [17] Radic, M. Z.; Erikson, J.; Litwin, S. und Weigert, M. (1993): B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors, *J Exp Med* 177 [4].
- [18] Gay, D.; Saunders, T.; Camper, S. und Weigert, M. (1993): Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance, *J Exp Med* 177 [4].
- [19] Tiegs, S. L.; Russell, D. M. und Nemazee, D. (1993): Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells, *J Exp Med* 177 [4].
- [20] Hertz, M. und Nemazee, D. (1997): BCR ligation induces receptor editing in IgM+IgD- bone marrow B cells in vitro, *Immunity* 6 [4].
- [21] Garside, P.; Ingulli, E.; Merica, R. R.; Johnson, J. G.; Noelle, R. J. und Jenkins, M. K. (1998): Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node, *Science* 281 [5373].
- [22] Cyster, J. G. (1999): Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs, *Science* 286 [5447].
- [23] Ahmed, R. und Gray, D. (1996): Immunological memory and protective immunity: understanding their relation, *Science* 272 [5258].
- [24] MacLennan, I. C. (1994): Germinal centers, *Annu Rev Immunol* 12.
- [25] McHeyzer-Williams, M. G. (1997): Immune response decisions at the single cell level, *Semin Immunol* 9 [4].
- [26] Ho, F.; Lortan, J. E.; MacLennan, I. C. und Khan, M. (1986): Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations, *Eur J Immunol* 16 [10].
- [27] Jacob, J.; Kassir, R. und Kelsoe, G. (1991): In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations, *J Exp Med* 173 [5].
- [28] Smith, K. G.; Hewitson, T. D.; Nossal, G. J. und Tarlinton, D. M. (1996): The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci, *Eur J Immunol* 26 [2].
- [29] Liu, Y. J.; Zhang, J.; Lane, P. J.; Chan, E. Y. und MacLennan, I. C. (1991): Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens, *Eur J Immunol* 21 [12].
- [30] Toellner, K. M.; Gulbranson-Judge, A.; Taylor, D. R.; Sze, D. M. und MacLennan, I. C. (1996): Immunoglobulin switch transcript production in vivo related to the site and time of antigen-specific B cell activation, *J Exp Med* 183 [5].
- [31] Liu, Y. J.; Johnson, G. D.; Gordon, J. und MacLennan, I. C. (1992): Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses, *Immunol Today* 13 [1].
- [32] MacLennan, I. C.; Liu, Y. J. und Johnson, G. D. (1992): Maturation and dispersal of B-cell clones during T cell-dependent antibody responses, *Immunol Rev* 126.
- [33] McKean, D.; Huppi, K.; Bell, M.; Staudt, L.; Gerhard, W. und Weigert, M. (1984): Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 [10].

- [34] Allen, D.; Cumano, A.; Dildrop, R.; Kocks, C.; Rajewsky, K.; Rajewsky, N.; Roes, J.; Sablitzky, F. und Siekevitz, M. (1987): Timing, genetic requirements and functional consequences of somatic hypermutation during B-cell development, *Immunol Rev* 96.
- [35] Berek, C. und Milstein, C. (1987): Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response, *Immunol Rev* 96.
- [36] Berek, C.; Berger, A. und Apel, M. (1991): Maturation of the immune response in germinal centers, *Cell* 67 [6].
- [37] Jacob, J.; Kelsoe, G.; Rajewsky, K. und Weiss, U. (1991): Intracloonal generation of antibody mutants in germinal centres, *Nature* 354 [6352].
- [38] Ziegner, M.; Steinhäuser, G. und Berek, C. (1994): Development of antibody diversity in single germinal centers: selective expansion of high-affinity variants, *Eur J Immunol* 24 [10].
- [39] Qin, D.; Wu, J.; Vora, K. A.; Ravetch, J. V.; Szakal, A. K.; Manser, T. und Tew, J. G. (2000): Fc gamma receptor IIB on follicular dendritic cells regulates the B cell recall response, *J Immunol* 164 [12].
- [40] Carroll, M. C. (1998): The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity, *Annu Rev Immunol* 16.
- [41] Fischer, M. B.; Goerg, S.; Shen, L.; Prodeus, A. P.; Goodnow, C. C.; Kelsoe, G. und Carroll, M. C. (1998): Dependence of germinal center B cells on expression of CD21/CD35 for survival, *Science* 280 [5363].
- [42] van Eijk, M.; Defrance, T.; Hennino, A. und de Groot, C. (2001): Death-receptor contribution to the germinal-center reaction, *Trends Immunol* 22 [12].
- [43] Diaz, M. und Casali, P. (2002): Somatic immunoglobulin hypermutation, *Curr Opin Immunol* 14 [2].
- [44] Shimizu, A. und Honjo, T. (1984): Immunoglobulin class switching, *Cell* 36 [4].
- [45] Kosco, M. H.; Pflugfelder, E. und Gray, D. (1992): Follicular dendritic cell-dependent adhesion and proliferation of B cells in vitro, *J Immunol* 148 [8].
- [46] Lindhout, E.; Mevissen, M. L.; Kwekkeboom, J.; Tager, J. M. und de Groot, C. (1993): Direct evidence that human follicular dendritic cells (FDC) rescue germinal centre B cells from death by apoptosis, *Clin Exp Immunol* 91 [2].
- [47] Liu, Y. J.; Joshua, D. E.; Williams, G. T.; Smith, C. A.; Gordon, J. und MacLennan, I. C. (1989): Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres, *Nature* 342 [6252].
- [48] Honjo, T.; Kinoshita, K. und Muramatsu, M. (2002): Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation, *Annu Rev Immunol* 20.
- [49] Manis, J. P.; Tian, M. und Alt, F. W. (2002): Mechanism and control of class-switch recombination, *Trends Immunol* 23 [1].
- [50] Storb, U. und Stavnezer, J. (2002): Immunoglobulin genes: generating diversity with AID and UNG, *Curr Biol* 12 [21].
- [51] Putterman, C.; Limpanasithikul, W.; Edelman, M. und Diamond, B. (1996): The double edged sword of the immune response: mutational analysis of a murine anti-pneumococcal, anti-DNA antibody, *J Clin Invest* 97 [10].
- [52] Hentges, F. (1994): B lymphocyte ontogeny and immunoglobulin production, *Clin Exp Immunol* 97 Suppl 1.
- [53] Liu, Y. J.; Mason, D. Y.; Johnson, G. D.; Abbot, S.; Gregory, C. D.; Hardie, D. L.; Gordon, J. und MacLennan, I. C. (1991): Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis, *Eur J Immunol* 21 [8].
- [54] Ray, S. K.; Putterman, C. und Diamond, B. (1996): Pathogenic autoantibodies are routinely generated during the response to foreign antigen: a paradigm for autoimmune disease, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 [5].
- [55] Borretzen, M.; Chapman, C.; Natvig, J. B. und Thompson, K. M. (1997): Differences in mutational patterns between rheumatoid factors in health and disease are related to variable heavy chain family and germ-line gene usage, *Eur J Immunol* 27 [3].
- [56] Isenberg, D.; Rahman, M. A.; Ravirajan, C. T. und Kalsi, J. K. (1997): Anti-DNA antibodies: from gene usage to crystal structures, *Immunol Today* 18 [4].
- [57] Coico, R. F.; Bhogal, B. S. und Thorbecke, G. J. (1983): Relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunologic memory. VI. Transfer of B cell memory with lymph node cells fractionated according to their receptors for peanut agglutinin, *J Immunol* 131 [5].
- [58] Klaus, G. G. (1978): The generation of memory cells. II. Generation of B memory cells with preformed antigen-antibody complexes, *Immunology* 34 [4].
- [59] Klaus, G. G. und Humphrey, J. H. (1977): The generation of memory cells. I. The role of C3 in the generation of B memory cells, *Immunology* 33 [1].
- [60] McHeyzer-Williams, M. G.; McLean, M. J.; Lalor, P. A. und Nossal, G. J. (1993): Antigen-driven B cell differentiation in vivo, *J Exp Med* 178 [1].
- [61] Benner, R.; Hijmans, W. und Haaijman, J. J. (1981): The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation, *Clin Exp Immunol* 46 [1].
- [62] Cassese, G.; Lindenau, S.; de Boer, B.; Arce, S.; Hauser, A.; Riemekasten, G.; Berek, C.; Hiepe, F.; Krenn, V.; Radbruch, A. und Manz, R. A. (2001): Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells, *Eur J Immunol* 31 [9].
- [63] Kunkel, E. J. und Butcher, E. C. (2003): Plasma-cell homing, *Nat Rev Immunol* 3 [10].
- [64] Kawano, M. M.; Mihara, K.; Huang, N.; Tsujimoto, T. und Kuramoto, A. (1995): Differentiation of early plasma cells on bone marrow stromal cells requires interleukin-6 for escaping from apoptosis, *Blood* 85 [2].
- [65] Merville, P.; Dechanet, J.; Desmouliere, A.; Durand, I.; de Bouteiller, O.; Garrone, P.; Banchereau, J. und Liu, Y. J. (1996): Bcl-2+ tonsillar plasma cells are rescued from apoptosis by bone marrow fibroblasts, *J Exp Med* 183 [1].

- [66] Manz, R. A.; Thiel, A. und Radbruch, A. (1997): Lifetime of plasma cells in the bone marrow, *Nature* 388 [6638].
- [67] Storb, U.; Engler, P.; Manz, J.; Gollahan, K.; Denis, K.; Lo, D. und Brinster, R. (1988): Expression of immunoglobulin genes in transgenic mice and transfected cells, *Ann N Y Acad Sci* 546.
- [68] Hauser, A. E.; Muehlinghaus, G.; Manz, R. A.; Cassese, G.; Arce, S.; Debes, G. F.; Hamann, A.; Berek, C.; Lindenau, S.; Doerner, T.; Hiepe, F.; Odendahl, M.; Riemekasten, G.; Krenn, V. und Radbruch, A. (2003): Long-lived plasma cells in immunity and inflammation, *Ann N Y Acad Sci* 987.
- [69] Radbruch, A.; Muehlinghaus, G.; Luger, E. O.; Inamine, A.; Smith, K. G.; Dorner, T. und Hiepe, F. (2006): Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell, *Nat Rev Immunol* 6 [10].
- [70] Vieira, P. und Rajewsky, K. (1990): Persistence of memory B cells in mice deprived of T cell help, *Int Immunol* 2 [6].
- [71] Ochsenbein, A. F.; Pinschewer, D. D.; Sierro, S.; Horvath, E.; Hengartner, H. und Zinkernagel, R. M. (2000): Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [24].
- [72] Hebeis, B. J.; Klenovsek, K.; Rohwer, P.; Ritter, U.; Schneider, A.; Mach, M. und Winkler, T. H. (2004): Activation of virus-specific memory B cells in the absence of T cell help, *J Exp Med* 199 [4].
- [73] Schwickert, T. A.; Lindquist, R. L.; Shakhar, G.; Livshits, G.; Skokos, D.; Kosco-Vilbois, M. H.; Dustin, M. L. und Nussenzweig, M. C. (2007): In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure, *Nature* 446 [7131].
- [74] Scheel T (2005): Lokalisation und Diversifizierung der sekundären B-Zell-Antwort, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen.
- [75] Toellner, K. M.; Jenkinson, W. E.; Taylor, D. R.; Khan, M.; Sze, D. M.; Sansom, D. M.; Vinuesa, C. G. und MacLennan, I. C. (2002): Low-level hypermutation in T cell-independent germinal centers compared with high mutation rates associated with T cell-dependent germinal centers, *J Exp Med* 195 [3].
- [76] Griffiths, G. M.; Berek, C.; Kaartinen, M. und Milstein, C. (1984): Somatic mutation and the maturation of immune response to 2-phenyl oxazolone, *Nature* 312 [5991].
- [77] Berek, C. (1993): Somatic mutation and memory, *Curr Opin Immunol* 5 [2].
- [78] Berek, C. und Ziegner, M. (1993): The maturation of the immune response, *Immunol Today* 14 [8].
- [79] Vladutiu, A. O. (2000): Immunoglobulin D: properties, measurement, and clinical relevance, *Clin Diagn Lab Immunol* 7 [2].
- [80] Chen, K.; Xu, W.; Wilson, M.; He, B.; Miller, N. W.; Bengten, E.; Edholm, E. S.; Santini, P. A.; Rath, P.; Chiu, A.; Cattalini, M.; Litzman, J.; Bussell J; Huang, B.; Meini, A.; Riesbeck, K.; Cunningham-Rundles, C.; Plebani, A. und Cerutti, A. (2009): Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils, *Nat Immunol* 10 [8].
- [81] Wellmann, U.; Letz, M.; Herrmann, M.; Angermüller, S.; Kalden, J. R. und Winkler, T. H. (2005): The evolution of human anti-double-stranded DNA autoantibodies, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 [26].
- [82] Tiller, T.; Tsuiji, M.; Yurasov, S.; Velinzon, K.; Nussenzweig, M. C. und Wardemann, H. (2007): Autoreactivity in human IgG⁺ memory B cells, *Immunity* 26 [2].
- [83] Mietzner, B.; Tsuiji, M.; Scheid, J.; Velinzon, K.; Tiller, T.; Abraham, K.; Gonzalez, J. B.; Pascual, V.; Stichweh, D.; Wardemann, H. und Nussenzweig, M. C. (2008): Autoreactive IgG memory antibodies in patients with systemic lupus erythematosus arise from nonreactive and polyreactive precursors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 [28].
- [84] Samuels, J.; Ng, Y. S.; Coupillaud, C.; Paget, D. und Meffre, E. (2005): Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis, *J Exp Med* 201 [10].
- [85] Hettenkofer, A. J. (1989): *Rheumatologie, Diagnostik - Klinik - Therapie*, 2. überarbeitete Auflage, Thieme.
- [86] Wolfe, F.; Mitchell, D. M.; Sibley, J. T.; Fries, J. F.; Bloch, D. A.; Williams, C. A.; Spitz, P. W.; Haga, M.; Kleinheksel, S. M. und Cathey, M. A. (1994): The mortality of rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 37 [4].
- [87] Erhardt, C. C.; Mumford, P. A.; Venables, P. J. und Maini, R. N. (1989): Factors predicting a poor life prognosis in rheumatoid arthritis: an eight year prospective study, *Ann Rheum Dis* 48 [1].
- [88] Pincus, T. und Callahan, L. F. (1993): The 'side effects' of rheumatoid arthritis: joint destruction, disability and early mortality, *Br J Rheumatol* 32 Suppl 1.
- [89] Arnett, F. C.; Edworthy, S. M.; Bloch, D. A.; McShane, D. J.; Fries, J. F.; Cooper, N. S.; Healey, L. A.; Kaplan, S. R.; Liang, M. H.; Luthra, H. S. und et al. (1988): The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 31 [3].
- [90] Torrigiani, G. und Roitt, I. M. (1967): Antiglobulin factors in sera from patients with rheumatoid arthritis and normal subjects. Quantitative estimation in different immunoglobulin classes, *Ann Rheum Dis* 26 [4].
- [91] Smolen, J. S. (1996): Autoantibodies in rheumatoid arthritis, *Manual of Biological Marker of Disease*: Edited by van Venrooij WJ & Maini RN. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, section C1.1): p.1-18.
- [92] Mageed, R. A. (1996): The RF antigen, *Manual of Biological Marker of Disease*: Edited by van Venrooij WJ & Maini RN. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, section B1.1): p.1-27.
- [93] Pai, S.; Pai, L. und Birkenfeldt, R. (1998): Correlation of serum IgA rheumatoid factor levels with disease severity in rheumatoid arthritis, *Scand J Rheumatol* 27 [4].
- [94] Houssien, D. A.; Jonsson, T.; Davies, E. und Scott, D. L. (1997): Clinical significance of IgA rheumatoid factor subclasses in rheumatoid arthritis, *J Rheumatol* 24 [11].
- [95] Teitsson, I.; Withrington, R. H.; Seifert, M. H. und Valdimarsson, H. (1984): Prospective study of early rheumatoid arthritis. I. Prognostic value of IgA rheumatoid factor, *Ann Rheum Dis* 43 [5].

- [96] Teitsson, I. (1988): IgA rheumatoid factor as predictor of disease activity, Scand J Rheumatol Suppl 75.
- [97] Vossenaar, E. R.; Despres, N.; Lapointe, E.; van der Heijden, A.; Lora, M.; Senshu, T.; van Venrooij, W. J. und Menard, H. A. (2004): Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin, Arthritis Res Ther 6 [2].
- [98] Despres, N.; Boire, G.; Lopez-Longo, F. J. und Menard, H. A. (1994): The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis, J Rheumatol 21 [6].
- [99] Reparón-Schuijt, C. C.; van Esch, W. J.; van Kooten, C.; Schellekens, G. A.; de Jong, B. A.; van Venrooij, W. J.; Breedveld, F. C. und Verweij, C. L. (2001): Secretion of anti-citrulline-containing peptide antibody by B lymphocytes in rheumatoid arthritis, Arthritis Rheum 44 [1].
- [100] Wiik, A. S. (2007): The immune response to citrullinated proteins in patients with rheumatoid arthritis: genetic, clinical, technical, and epidemiological aspects, Clin Rev Allergy Immunol 32 [1].
- [101] Steiner, G. (2007): Auto-antibodies and autoreactive T-cells in rheumatoid arthritis: pathogenetic players and diagnostic tools, Clin Rev Allergy Immunol 32 [1].
- [102] Steiner, G. und Smolen, J. (2002): Autoantibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance, Arthritis Res 4 Suppl 2.
- [103] Vossenaar, E. R.; Radstake, T. R.; van der Heijden, A.; van Mansum, M. A.; Dieteren, C.; de Rooij, D. J.; Barrera, P.; Zendman, A. J. und van Venrooij, W. J. (2004): Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages, Ann Rheum Dis 63 [4].
- [104] Utz, P. J.; Genovese, M. C. und Robinson, W. H. (2004): Unlocking the "PAD" lock on rheumatoid arthritis, Ann Rheum Dis 63 [4].
- [105] Vencovsky, J.; Machacek, S.; Sedova, L.; Kafkova, J.; Gatterova, J.; Pesakova, V. und Ruzickova, S. (2003): Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis, Ann Rheum Dis 62 [5].
- [106] Caporali, R.; Bugatti, S.; Bruschi, E.; Cavagna, L. und Montecucco, C. (2005): Autoantibodies to heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, Autoimmunity 38 [1].
- [107] He, Y. und Smith, R. (2009): Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B, Cell Mol Life Sci 66 [7].
- [108] Tuailon, N.; Muller, S.; Pasquali, J. L.; Bordigoni, P.; Youinou, P. und Van Regenmortel, M. H. (1990): Antibodies from patients with rheumatoid arthritis and juvenile chronic arthritis analyzed with core histone synthetic peptides, Int Arch Allergy Appl Immunol 91 [3].
- [109] Terato, K.; Shimosuru, Y.; Katayama, K.; Takemitsu, Y.; Yamashita, I.; Miyatsu, M.; Fujii, K.; Sagara, M.; Kobayashi, S.; Goto, M. und et al. (1990): Specificity of antibodies to type II collagen in rheumatoid arthritis, Arthritis Rheum 33 [10].
- [110] Klareskog, L. und Olsson, T. (1990): Autoimmunity to collagen II and myelin basic protein: comparative studies in humans and rodents, Immunol Rev 118.
- [111] Mimori, T.; Suganuma, K.; Tanami, Y.; Nojima, T.; Matsumura, M.; Fujii, T.; Yoshizawa, T.; Suzuki, K. und Akizuki, M. (1995): Autoantibodies to calpastatin (an endogenous inhibitor for calcium-dependent neutral protease, calpain) in systemic rheumatic diseases, Proc Natl Acad Sci U S A 92 [16].
- [112] Despres, N.; Talbot, G.; Plouffe, B.; Boire, G. und Menard, H. A. (1995): Detection and expression of a cDNA clone that encodes a polypeptide containing two inhibitory domains of human calpastatin and its recognition by rheumatoid arthritis sera, J Clin Invest 95 [4].
- [113] Corrigan, V. M.; Bodman-Smith, M. D.; Fife, M. S.; Canas, B.; Myers, L. K.; Wooley, P.; Soh, C.; Staines, N. A.; Pappin, D. J.; Berlo, S. E.; van Eden, W.; van Der Zee, R.; Lanchbury, J. S. und Panayi, G. S. (2001): The human endoplasmic reticulum molecular chaperone BiP is an autoantigen for rheumatoid arthritis and prevents the induction of experimental arthritis, J Immunol 166 [3].
- [114] Stastny, P. (1978): Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis, N Engl J Med 298 [16].
- [115] Feldmann, M.; Brennan, F. M.; Chantry, D.; Haworth, C.; Turner, M.; Abney, E.; Buchan, G.; Barrett, K.; Barkley, D.; Chu, A. und et al. (1990): Cytokine production in the rheumatoid joint: implications for treatment, Ann Rheum Dis 49 Suppl 1.
- [116] Muller-Ladner, U. und Gay, S. (2002): MMPs and rheumatoid synovial fibroblasts: Siamese twins in joint destruction?, Ann Rheum Dis 61 [11].
- [117] Yamanishi, Y. und Firestein, G. S. (2001): Pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of synoviocytes, Rheum Dis Clin North Am 27 [2].
- [118] Cunnane, G.; Hummel, K. M.; Muller-Ladner, U.; Gay, R. E. und Gay, S. (1998): Mechanism of joint destruction in rheumatoid arthritis, Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 46 [1].
- [119] Fassbender, H. G. (1986): *Normal and pathological synovial tissue with emphasis on rheumatoid arthritis*, In: Rheumatology and Immunology, 2nd Ed.(ed.A.S.Cohen and J.C.Bennett), Orlando-New York: Grüne & Stratton, 36-42.ISBN 978-0-8089-1809-7.
- [120] Fassbender, H. G. (1984): Rheumatoide Arthritis, In: Spezielle pathologische Anatomie Bd.18 Pathologie der Gelenk und Weichteiltumoren, ed.W.Doerr, G.Seifert.Berlin/Heidelberg: Springer, 191-229.
- [121] Bernasconi, N. L.; Traggiai, E. und Lanzavecchia, A. (2002): Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells, Science 298 [5601].
- [122] Berek, C. und Kim, H. J. (1997): B-cell activation and development within chronically inflamed synovium in rheumatoid and reactive arthritis, Semin Immunol 9 [4].
- [123] Schroder, A. E.; Greiner, A.; Seyfert, C. und Berek, C. (1996): Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis, Proc Natl Acad Sci U S A 93 [1].

- [124] Kim, H. J.; Krenn, V.; Steinhauser, G. und Berek, C. (1999): Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis, *J Immunol* 162 [5].
- [125] de Boer, B. A.; Voigt, I.; Kim, H. J.; Camacho, S. A.; Lipp, M.; Forster, R. und Berek, C. (2000): Affinity maturation in ectopic germinal centers, *Curr Top Microbiol Immunol* 251.
- [126] Gause, A.; Gundlach, K.; Zdichavsky, M.; Jacobs, G.; Koch, B.; Hopf, T. und Pfreundschuh, M. (1995): The B lymphocyte in rheumatoid arthritis: analysis of rearranged V kappa genes from B cells infiltrating the synovial membrane, *Eur J Immunol* 25 [10].
- [127] Weyand, C. M. und Goronzy, J. J. (2003): Ectopic germinal center formation in rheumatoid synovitis, *Ann N Y Acad Sci* 987.
- [128] Smolen, J. S. und Steiner, G. (2003): Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis, *Nat Rev Drug Discov* 2 [6].
- [129] Vos, K.; Thurlings, R. M.; Wijbrandts, C. A.; van Schaardenburg, D.; Gerlag, D. M. und Tak, P. P. (2007): Early effects of rituximab on the synovial cell infiltrate in patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 56 [3].
- [130] Thurlings, R. M.; Vos, K.; Wijbrandts, C. A.; Zwinderman, A. H.; Gerlag, D. M. und Tak, P. P. (2008): Synovial tissue response to rituximab: mechanism of action and identification of biomarkers of response, *Ann Rheum Dis* 67 [7].
- [131] Bridges, S. L., Jr.; Lee, S. K.; Koopman, W. J. und Schroeder, H. W., Jr. (1993): Analysis of immunoglobulin gamma heavy chain expression in synovial tissue of a patient with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 36 [5].
- [132] Williams, D. G. und Taylor, P. C. (1997): Clonal analysis of immunoglobulin mRNA in rheumatoid arthritis synovium: characterization of expanded IgG3 populations, *Eur J Immunol* 27 [2].
- [133] Williams, D. G. und Taylor, P. C. (1997): Length diversity of immunoglobulin heavy-chain variable regions from rheumatoid arthritis synovium, *Ann N Y Acad Sci* 815.
- [134] Brezinschek, H. P.; Foster, S. J.; Brezinschek, R. I.; Dorner, T.; Domiati-Saad, R. und Lipsky, P. E. (1997): Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells, *J Clin Invest* 99 [10].
- [135] Smilevska, T.; Tsakou, E.; Hadzidimitriou, A.; Bikos, V.; Stavroyianni, N.; Laoutaris, N.; Fassas, A.; Alphanagnostopoulos, A.; Papadaki, T.; Belessi, C. und Stamatopoulos, K. (2008): Immunoglobulin kappa gene repertoire and somatic hypermutation patterns in follicular lymphoma, *Blood Cells Mol Dis* 41 [2].
- [136] Cohen, P. L.; Cheek, R. L.; Hadler, J. A.; Yount, W. J. und Eisenberg, R. A. (1987): The subclass distribution of human IgG rheumatoid factor, *J Immunol* 139 [5].
- [137] Zack, D. J.; Stempniak, M.; Wong, A. L. und Weisbart, R. H. (1995): Localization of an Fc-binding reactivity to the constant region of human IgG4. Implications for the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *J Immunol* 155 [10].
- [138] Chapuy-Regaud, S.; Nogueira, L.; Clavel, C.; Sebbag, M.; Vincent, C. und Serre, G. (2005): IgG subclass distribution of the rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated fibrin, *Clin Exp Immunol* 139 [3].
- [139] Rispens, T.; Ooievaar-De Heer, P.; Vermeulen, E.; Schuurman, J.; van der Neut Kofschoten, M. und Aalberse, R. C. (2009): Human IgG4 binds to IgG4 and conformationally altered IgG1 via Fc-Fc interactions, *J Immunol* 182 [7].
- [140] Meffre, E.; Schaefer, A.; Wardemann, H.; Wilson, P.; Davis, E. und Nussenzweig, M. C. (2004): Surrogate light chain expressing human peripheral B cells produce self-reactive antibodies, *J Exp Med* 199 [1].
- [141] Tiller, T.; Meffre, E.; Yurasov, S.; Tsuiji, M.; Nussenzweig, M. C. und Wardemann, H. (2008): Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning, *J Immunol Methods* 329 [1-2].
- [142] Moen, K.; Brun, J. G.; Madland, T. M.; Tynning, T. und Jonsson, R. (2003): Immunoglobulin G and A antibody responses to *Bacteroides forsythus* and *Prevotella intermedia* in sera and synovial fluids of arthritis patients, *Clin Diagn Lab Immunol* 10 [6].
- [143] Pischon, N.; Pischon, T.; Kroger, J.; Gulmez, E.; Kleber, B. M.; Bernimoulin, J. P.; Landau, H.; Brinkmann, P. G.; Schlattmann, P.; Zernicke, J.; Buttgerit, F. und Detert, J. (2008): Association among rheumatoid arthritis, oral hygiene, and periodontitis, *J Periodontol* 79 [6].
- [144] Pischon, N.; Roehner, E.; Hocke, A.; N'Guessan, P.; Mueller, H. C.; Matziolis, G.; Kanitz, V.; Purucker, P.; Kleber, B. M.; Bernimoulin, J. P.; Burmester, G.; Buttgerit, F. und Detert, J. (2008): Effects of *Porphyromonas gingivalis* on cell cycle progression and apoptosis of primary human chondrocytes, *Ann Rheum Dis*.
- [145] Cantaert, T.; Kolln, J.; Timmer, T.; van der Pouw Kraan, T. C.; Vandooren, B.; Thurlings, R. M.; Canete, J. D.; Catrina, A. I.; Out, T.; Verweij, C. L.; Zhang, Y.; Tak, P. P. und Baeten, D. (2008): B lymphocyte autoimmunity in rheumatoid synovitis is independent of ectopic lymphoid neogenesis, *J Immunol* 181 [1].
- [146] Randen, I.; Pascual, V.; Victor, K.; Thompson, K. M.; Forre, O.; Capra, J. D. und Natvig, J. B. (1993): Synovial IgG rheumatoid factors show evidence of an antigen-driven immune response and a shift in the V gene repertoire compared to IgM rheumatoid factors, *Eur J Immunol* 23 [6].
- [147] Randen, I.; Brown, D.; Thompson, K. M.; Hughes-Jones, N.; Pascual, V.; Victor, K.; Capra, J. D.; Forre, O. und Natvig, J. B. (1992): Clonally related IgM rheumatoid factors undergo affinity maturation in the rheumatoid synovial tissue, *J Immunol* 148 [10].
- [148] Itoh, K.; Patki, V.; Furie, R. A.; Chartash, E. K.; Jain, R. I.; Lane, L.; Asnis, S. E. und Chiorazzi, N. (2000): Clonal expansion is a characteristic feature of the B-cell repertoire of patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Res* 2 [1].
- [149] van der Neut Kofschoten, M.; Schuurman, J.; Losen, M.; Bleeker, W. K.; Martinez-Martinez, P.; Vermeulen, E.; den Bleker, T. H.; Wiegman, L.; Vink, T.; Aarden, L. A.; De Baets, M. H.; van de Winkel, J. G.; Aalberse, R. C.

- und Parren, P. W. (2007): Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange, *Science* 317 [5844].
- [150] Storb, U.; Peters, A.; Klotz, E.; Kim, N.; Shen, H. M.; Kage, K.; Rogerson, B. und Martin, T. E. (1998): Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription, *Curr Top Microbiol Immunol* 229.
- [151] Mao, C.; Jiang, L.; Melo-Jorge, M.; Puthenveetil, M.; Zhang, X.; Carroll, M. C. und Imanishi-Kari, T. (2004): T cell-independent somatic hypermutation in murine B cells with an immature phenotype, *Immunity* 20 [2].
- [152] Weller, S.; Mamani-Matsuda, M.; Picard, C.; Cordier, C.; Lecoeuche, D.; Gauthier, F.; Weill, J. C. und Reynaud, C. A. (2008): Somatic diversification in the absence of antigen-driven responses is the hallmark of the IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ B cell repertoire in infants, *J Exp Med* 205 [6].
- [153] Weill, J. C.; Weller, S. und Reynaud, C. A. (2004): A bird's eye view on human B cells, *Semin Immunol* 16 [4].
- [154] Weller, S.; Braun, M. C.; Tan, B. K.; Rosenwald, A.; Cordier, C.; Conley, M. E.; Plebani, A.; Kumararatne, D. S.; Bonnet, D.; Tournilhac, O.; Tchernia, G.; Steiniger, B.; Staudt, L. M.; Casanova, J. L.; Reynaud, C. A. und Weill, J. C. (2004): Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire, *Blood* 104 [12].
- [155] Masson-Bessiere, C.; Sebbag, M.; Durieux, J. J.; Nogueira, L.; Vincent, C.; Girbal-Neuhausser, E.; Durroux, R.; Cantagrel, A. und Serre, G. (2000): In the rheumatoid pannus, anti-filaggrin autoantibodies are produced by local plasma cells and constitute a higher proportion of IgG than in synovial fluid and serum, *Clin Exp Immunol* 119 [3].
- [156] Batista, F. D. und Neuberger, M. S. (1998): Affinity dependence of the B cell response to antigen: a threshold, a ceiling, and the importance of off-rate, *Immunity* 8 [6].
- [157] Kunkel, E. J.; Kim, C. H.; Lazarus, N. H.; Vierra, M. A.; Soler, D.; Bowman, E. P. und Butcher, E. C. (2003): CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells, *J Clin Invest* 111 [7].
- [158] Lazarus, N. H.; Kunkel, E. J.; Johnston, B.; Wilson, E.; Youngman, K. R. und Butcher, E. C. (2003): A common mucosal chemokine (mucosae-associated epithelial chemokine/CCL28) selectively attracts IgA plasmablasts, *J Immunol* 170 [7].
- [159] Bowman, E. P.; Kuklin, N. A.; Youngman, K. R.; Lazarus, N. H.; Kunkel, E. J.; Pan, J.; Greenberg, H. B. und Butcher, E. C. (2002): The intestinal chemokine thymus-expressed chemokine (CCL25) attracts IgA antibody-secreting cells, *J Exp Med* 195 [2].
- [160] Hieshima, K.; Ohtani, H.; Shibano, M.; Izawa, D.; Nakayama, T.; Kawasaki, Y.; Shiba, F.; Shiota, M.; Katou, F.; Saito, T. und Yoshie, O. (2003): CCL28 has dual roles in mucosal immunity as a chemokine with broad-spectrum antimicrobial activity, *J Immunol* 170 [3].
- [161] Youngman, K. R.; Franco, M. A.; Kuklin, N. A.; Rott, L. S.; Butcher, E. C. und Greenberg, H. B. (2002): Correlation of tissue distribution, developmental phenotype, and intestinal homing receptor expression of antigen-specific B cells during the murine anti-rotavirus immune response, *J Immunol* 168 [5].
- [162] Farstad, I. N.; Halstensen, T. S.; Lazarovits, A. I.; Norstein, J.; Fausa, O. und Brandtzaeg, P. (1995): Human intestinal B-cell blasts and plasma cells express the mucosal homing receptor integrin alpha 4 beta 7, *Scand J Immunol* 42 [6].
- [163] Johansson, C.; Ahlstedt, I.; Furubacka, S.; Johnsson, E.; Agace, W. W. und Quiding-Jarbrink, M. (2005): Differential expression of chemokine receptors on human IgA⁺ and IgG⁺ B cells, *Clin Exp Immunol* 141 [2].
- [164] Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 [12].
- [165] Croce, C. M.; Shander, M.; Martinis, J.; Cicurel, L.; D'Ancona, G. G.; Dolby, T. W. und Koprowski, H. (1979): Chromosomal location of the genes for human immunoglobulin heavy chains, *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 [7].
- [166] Kirsch, I. R.; Morton, C. C.; Nakahara, K. und Leder, P. (1982): Human immunoglobulin heavy chain genes map to a region of translocations in malignant B lymphocytes, *Science* 216 [4543].
- [167] McBride, O. W.; Battey, J.; Hollis, G. F.; Swan, D. C.; Siebenlist, U. und Leder, P. (1982): Localization of human variable and constant region immunoglobulin heavy chain genes on subtelomeric band q32 of chromosome 14, *Nucleic Acids Res* 10 [24].
- [168] Scaviner, D.; Barbie, V.; Ruiz, M. und Lefranc, M. P. (1999): Protein displays of the human immunoglobulin heavy, kappa and lambda variable and joining regions, *Exp Clin Immunogenet* 16 [4].
- [169] Shin, E. K.; Matsuda, F.; Nagaoka, H.; Fukita, Y.; Imai, T.; Yokoyama, K.; Soeda, E. und Honjo, T. (1991): Physical map of the 3' region of the human immunoglobulin heavy chain locus: clustering of autoantibody-related variable segments in one haplotype, *EMBO J* 10 [12].
- [170] Matsuda, F.; Shin, E. K.; Nagaoka, H.; Matsumura, R.; Haino, M.; Fukita, Y.; Taka-ishi, S.; Imai, T.; Riley, J. H.; Anand, R. und et al. (1993): Structure and physical map of 64 variable segments in the 3'0.8-megabase region of the human immunoglobulin heavy-chain locus, *Nat Genet* 3 [1].
- [171] Cook, G. P.; Tomlinson, I. M.; Walter, G.; Riethman, H.; Carter, N. P.; Buluwela, L.; Winter, G. und Rabbitts, T. H. (1994): A map of the human immunoglobulin VH locus completed by analysis of the telomeric region of chromosome 14q, *Nat Genet* 7 [2].
- [172] Cook, G. P. und Tomlinson, I. M. (1995): The human immunoglobulin VH repertoire, *Immunol Today* 16 [5].
- [173] Matsuda, F.; Ishii, K.; Bourvagnet, P.; Kuma, K.; Hayashida, H.; Miyata, T. und Honjo, T. (1998): The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus, *J Exp Med* 188 [11].
- [174] Pallares, N.; Lefebvre, S.; Contet, V.; Matsuda, F. und Lefranc, M. P. (1999): The human immunoglobulin heavy variable genes, *Exp Clin Immunogenet* 16 [1].

- [175] Siebenlist, U.; Ravetch, J. V.; Korsmeyer, S.; Waldmann, T. und Leder, P. (1981): Human immunoglobulin D segments encoded in tandem multigenic families, *Nature* 294 [5842].
- [176] Buluwela, L.; Albertson, D. G.; Sherrington, P.; Rabbitts, P. H.; Spurr, N. und Rabbitts, T. H. (1988): The use of chromosomal translocations to study human immunoglobulin gene organization: mapping DH segments within 35 kb of the C mu gene and identification of a new DH locus, *EMBO J* 7 [7].
- [177] Ichihara, Y.; Matsuoka, H. und Kurosawa, Y. (1988): Organization of human immunoglobulin heavy chain diversity gene loci, *EMBO J* 7 [13].
- [178] Corbett, S. J.; Tomlinson, I. M.; Sonnhhammer, E. L.; Buck, D. und Winter, G. (1997): Sequence of the human immunoglobulin diversity (D) segment locus: a systematic analysis provides no evidence for the use of DIR segments, inverted D segments, "minor" D segments or D-D recombination, *J Mol Biol* 270 [4].
- [179] Ruiz, M.; Pallares, N.; Contet, V.; Barbi, V. und Lefranc, M. P. (1999): The human immunoglobulin heavy diversity (IGHD) and joining (IGHJ) segments, *Exp Clin Immunogenet* 16 [3].
- [180] Ravetch, J. V.; Siebenlist, U.; Korsmeyer, S.; Waldmann, T. und Leder, P. (1981): Structure of the human immunoglobulin mu locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes, *Cell* 27 [3 Pt 2].
- [181] Flanagan, J. G. und Rabbitts, T. H. (1982): Arrangement of human immunoglobulin heavy chain constant region genes implies evolutionary duplication of a segment containing gamma, epsilon and alpha genes, *Nature* 300 [5894].
- [182] Lefranc, M. P.; Lefranc, G. und Rabbitts, T. H. (1982): Inherited deletion of immunoglobulin heavy chain constant region genes in normal human individuals, *Nature* 300 [5894].
- [183] Lefranc, M. P.; Lefranc, G.; de Lange, G.; Out, T. A.; van den Broek, P. J.; van Nieuwkoop, J.; Radl, J.; Helal, A. N.; Chaabani, H.; van Loghem, E. und et al. (1983): Instability of the human immunoglobulin heavy chain constant region locus indicated by different inherited chromosomal deletions, *Mol Biol Med* 1 [2].
- [184] Rabbitts, T. H.; Forster, A. und Milstein, C. P. (1981): Human immunoglobulin heavy chain genes: evolutionary comparisons of C mu, C delta and C gamma genes and associated switch sequences, *Nucleic Acids Res* 9 [18].
- [185] White, M. B.; Shen, A. L.; Word, C. J.; Tucker, P. W. und Blattner, F. R. (1985): Human immunoglobulin D: genomic sequence of the delta heavy chain, *Science* 228 [4700].
- [186] Huck, S.; Fort, P.; Crawford, D. H.; Lefranc, M. P. und Lefranc, G. (1986): Sequence of a human immunoglobulin gamma 3 heavy chain constant region gene: comparison with the other human C gamma genes, *Nucleic Acids Res* 14 [4].
- [187] Huck, S.; Lefranc, G. und Lefranc, M. P. (1989): A human immunoglobulin IGHG3 allele (Gmb0,b1,c3,c5,u) with an IGHG4 converted region and three hinge exons, *Immunogenetics* 30 [4].
- [188] Ellison, J. W.; Berson, B. J. und Hood, L. E. (1982): The nucleotide sequence of a human immunoglobulin C gamma1 gene, *Nucleic Acids Res* 10 [13].
- [189] Max, E. E.; Battey, J.; Ney, R.; Kirsch, I. R. und Leder, P. (1982): Duplication and deletion in the human immunoglobulin epsilon genes, *Cell* 29 [2].
- [190] Bensmana, M.; Huck, S.; Lefranc, G. und Lefranc, M. P. (1988): The human immunoglobulin pseudo-gamma IGHGP gene shows no major structural defect, *Nucleic Acids Res* 16 [7].
- [191] Flanagan, J. G. und Rabbitts, T. H. (1982): The sequence of a human immunoglobulin epsilon heavy chain constant region gene, and evidence for three non-allelic genes, *EMBO J* 1 [5].
- [192] Bensmana, M.; Chuchana, P.; Lefranc, G. und Lefranc, M. P. (1991): Sequence of the CH1 and hinge-CH2 exons of the human immunoglobulin IGHA2 A2m(2) allele: comparison with the nonallelic and allelic IGHA genes, *Cytogenet Cell Genet* 56 [2].
- [193] Lefranc, M. P. (2004): IMGT-ONTOLOGY and IMGT databases, tools and Web resources for immunogenetics and immunoinformatics, *Mol Immunol* 40 [10].
- [194] McBride, O. W.; Hieter, P. A.; Hollis, G. F.; Swan, D.; Otey, M. C. und Leder, P. (1982): Chromosomal location of human kappa and lambda immunoglobulin light chain constant region genes, *J Exp Med* 155 [5].
- [195] Zachau, H. G. (1993): The immunoglobulin kappa locus-or-what has been learned from looking closely at one-tenth of a percent of the human genome, *Gene* 135 [1-2].
- [196] Huber, C.; Huber, E.; Lautner-Rieske, A.; Schable, K. F. und Zachau, H. G. (1993): The human immunoglobulin kappa locus. Characterization of the partially duplicated L regions, *Eur J Immunol* 23 [11].
- [197] Schable, K. F. und Zachau, H. G. (1993): The variable genes of the human immunoglobulin kappa locus, *Biol Chem Hoppe Seyler* 374 [11].
- [198] Cox, J. P.; Tomlinson, I. M. und Winter, G. (1994): A directory of human germ-line V kappa segments reveals a strong bias in their usage, *Eur J Immunol* 24 [4].
- [199] Barbie, V. und Lefranc, M. P. (1998): The human immunoglobulin kappa variable (IGKV) genes and joining (IGKJ) segments, *Exp Clin Immunogenet* 15 [3].
- [200] Hieter, P. A.; Maizel, J. V., Jr. und Leder, P. (1982): Evolution of human immunoglobulin kappa J region genes, *J Biol Chem* 257 [3].
- [201] Hieter, P. A.; Max, E. E.; Seidman, J. G.; Maizel, J. V., Jr. und Leder, P. (1980): Cloned human and mouse kappa immunoglobulin constant and J region genes conserve homology in functional segments, *Cell* 22 [1 Pt 1].
- [202] Lefranc, M. P. (2000): Locus maps and genomic repertoire of the human Ig genes, *The Immunologist* 3.
- [203] Lefranc, M. P. und Lefranc G. (2001): *The immunoglobulin Factsbook*, Academic Press, Hartcourt Publishers Limited, London, UK.
- [204] Lefranc, M. P. (2001): Nomenclature of the human immunoglobulin kappa (IGK) genes, *Exp Clin Immunogenet* 18 [3].

- [205] Emanuel, B. S.; Cannizzaro, L. A.; Magrath, I.; Tsujimoto, Y.; Nowell, P. C. und Croce, C. M. (1985): Chromosomal orientation of the lambda light chain locus: V lambda is proximal to C lambda in 22q11, *Nucleic Acids Res* 13 [2].
- [206] Pallares, N.; Fripiat, J. P.; Giudicelli, V. und Lefranc, M. P. (1998): The human immunoglobulin lambda variable (IGLV) genes and joining (IGLJ) segments, *Exp Clin Immunogenet* 15 [1].
- [207] Fripiat, J. P.; Williams, S. C.; Tomlinson, I. M.; Cook, G. P.; Cherif, D.; Le Paslier, D.; Collins, J. E.; Dunham, I.; Winter, G. und Lefranc, M. P. (1995): Organization of the human immunoglobulin lambda light-chain locus on chromosome 22q11.2, *Hum Mol Genet* 4 [6].
- [208] Kawasaki, K.; Minoshima, S.; Schooler, K.; Kudoh, J.; Asakawa, S.; de Jong, P. J. und Shimizu, N. (1995): The organization of the human immunoglobulin lambda gene locus, *Genome Res* 5 [2].
- [209] Williams, S. C.; Fripiat, J. P.; Tomlinson, I. M.; Ignatovich, O.; Lefranc, M. P. und Winter, G. (1996): Sequence and evolution of the human germline V lambda repertoire, *J Mol Biol* 264 [2].
- [210] Kawasaki, K.; Minoshima, S.; Nakato, E.; Shibuya, K.; Shintani, A.; Schmeits, J. L.; Wang, J. und Shimizu, N. (1997): One-megabase sequence analysis of the human immunoglobulin lambda gene locus, *Genome Res* 7 [3].
- [211] Hieter, P. A.; Hollis, G. F.; Korsmeyer, S. J.; Waldmann, T. A. und Leder, P. (1981): Clustered arrangement of immunoglobulin lambda constant region genes in man, *Nature* 294 [5841].
- [212] Taub, R. A.; Hollis, G. F.; Hieter, P. A.; Korsmeyer, S.; Waldmann, T. A. und Leder, P. (1983): Variable amplification of immunoglobulin lambda light-chain genes in human populations, *Nature* 304 [5922].
- [213] Vasicek, T. J. und Leder, P. (1990): Structure and expression of the human immunoglobulin lambda genes, *J Exp Med* 172 [2].
- [214] Ghanem, N.; Dariavach, P.; Bensmana, M.; Chibani, J.; Lefranc, G. und Lefranc, M. P. (1988): Polymorphism of immunoglobulin lambda constant region genes in populations from France, Lebanon and Tunisia, *Exp Clin Immunogenet* 5 [4].
- [215] Kay, P. H.; Moriuchi, J.; Ma, P. J. und Saueracker, E. (1992): An unusual allelic form of the immunoglobulin lambda constant region genes in the Japanese, *Immunogenetics* 35 [5].
- [216] Lefranc, M. P.; Pallares, N. und Fripiat, J. P. (1999): Allelic polymorphisms and RFLP in the human immunoglobulin lambda light chain locus, *Hum Genet* 104 [5].
- [217] Farner, N. L.; Dorner, T. und Lipsky, P. E. (1999): Molecular mechanisms and selection influence the generation of the human V lambda J lambda repertoire, *J Immunol* 162 [4].
- [218] Lefranc, M. P. (2001): Nomenclature of the human immunoglobulin lambda (IGL) genes, *Exp Clin Immunogenet* 18 [4].

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsarbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe keine als die hier angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet.

Berlin, 30.07.2009

Tobias Scheel